



UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR

Incorporada a la
Universidad Nacional Autónoma de México

**CARACTERIZACION DE LA CAPTACION
DEL 5α -ANDROSTANO- 3β , 17β -DIOL EN
FIBROBLASTOS HUMANOS NORMALES**

T E S I S

Que para obtener el Título de:
LICENCIADO EN BIOLOGIA

p r e s e n t a

TERESITA ESPINOSA JIMENEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	<i>pág.</i>
Abreviaturas utilizadas en el trabajo	17
Esteroides utilizados en el trabajo	19
Nombre trivial y sistemático en las enzimas citadas en el trabajo	21
RESUMEN	23
INTRODUCCION	25
Biosíntesis de Andrógenos	27
Metabolismo de Testosterona	28
Concentración de 3β -Androstandiol	31
Efectos Biológicos del 3β -Androstandiol	33
Mecanismo de Acción del 3β -Androstandiol	36
Fibroblastos como modelo biológico en el estudio de receptores citoplasmáticos	36
OBJETIVO DEL ESTUDIO	39
MATERIAL Y METODOS	
Material.	
Reactivos para cultivo celular	41
Compuestos marcados con isótopos radiactivos	41
Compuestos radioinertes	41
Limpieza de material	42
Métodos.	
Cultivo de células	42
Congelamiento celular	42
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.	
A. Estudio de la unión del 3β -Androstandiol en fibroblastos com- pletos	45

B. Estudio de la unión del 3β -Androstandiol en citosol	46
C. Estudio de la unión del 3β -Androstandiol a nivel subcelular.	47
D. Estudio de la unión del 3β -Androstandiol a nivel nuclear ..	47

RESULTADOS.

Influencia de diferentes concentraciones del 3β -diol radioinerte en la captación total de radiactividad	51
Especificidad de unión	51
Unión del 3β -diol a nivel citoplasmático	56
Estudios a nivel subcelular de la captación del 3β -diol	56
Cinética de unión del 3β -diol ^3H a fibroblastos	57
DISCUSION	61
CONCLUSION	67
APENDICE	69
REFERENCIAS	77

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TRABAJO

ADN	Acido Desoxirribonucleico.
C	Citosol.
CBG	Proteina Transportadora de Corticoesteroides (transcortina).
Ci	Curie
Δ^4 A	Androstendiona
DABA	Acido 3,5 Diamino benzoico.
DEX	Dexametasona.
5 α -DHT	5 α -Dihidrotestosterona.
3 β -diol	3 β -Androstandiol.
3 α -diol	3 α -Androstandiol.
D. O.	Densidad Optica.
dpm	Desintegraciones por minuto.
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Etilendiamino tetracetato disódico.
E ₂	Estradiol.
FHN	Fibroblastos Humanos Normales.
g	Gravedad.
LH	Hormona Luteinizante.
LH-RH	Hormona Liberadora de Gonadotropinas.
MEM	Medio Mínimo Esencial.
M	Molar.
mM	Milimolar.
μ l	Microlitro.
μ g	Microgramo.

N	Núcleo
NADPH	Fosfato de Nicotinamida Dinucleótido, forma reducida.
nm	Nanómetro.
3 β , 5 α -NET	3 β , 5 α -Noretisterona.
P ₄	Progesterona.
PBS	Solución Amortiguadora de fosfatos.
p/v	Peso/Volumen.
r max	Radio máximo.
RA	Receptor de Andrógenos.
RE	Receptor de Estrógenos.
RP ₄	Receptor de Progesterona.
rpm	Revoluciones por minuto.
S	Unidades Svedberg.
SHBG	Proteína transportadora de Hormonas Sexuales.
SFT	Suero fetal de ternera.
T	Testosterona.
TCA	Acido Tricloroacético.
U/ml	Unidades/mililitro.
v/v	Volumen/Volumen.

ESTEROIDES UTILIZADOS EN EL TRABAJO

<i>Nombre Trivial</i>	<i>Nombre Sistemático</i>
3 α ,5 α -Androstandiol	5 α -Androstano-3 α ,17 β -diol.
3 β ,5 α -Androstandiol	5 α -Androstano-3 β ,17 β -diol.
Δ^5 -Androstendiol	5-Androsteno-3 β ,17 β -diol.
Δ^4 -Androstendiona	4-Androsteno-3,17-diona.
Colesterol	5-Colesteno-3 β -ol.
Dehidroepiandrosterona	3 β -Hidroxi-5-androsteno-17 ona.
5 α -Dihidrotosterona	17 β -Hidroxi-5 α -androstano 3-ona.
17 α -Hidroxipregnenolona	3 β ,17 α -dihidroxi-5-pregнено 20-ona.
17 α -Hidroxiprogesteronona	17 α -Hidroxi-4-pregнено-3, 20-diona.
3 β ,5 α Noretisterona	17 α -Etilnil-5 α -estran-3 β , 17 β -diol.
Pregnenolona	3 β -Hidroxi-5-pregнено 20-ona.
Progesterona	4-Pregнено-3,20-diona.
Testosterona	17 β -Hidroxi-4-androsteno- 3-ona.
6 α -Triol	5 α -Androstano-3 β ,6 α , 17 β -triol.
7 α -Triol	5 α -Androstano-3 β ,7 α , 17 β -triol.

NOMBRE TRIVIAL Y SISTEMÁTICO DE LAS ENZIMAS CITADAS EN EL TRABAJO

<i>Nombre Trivial</i>	<i>Nombre Sistemático</i>
3 β -ol deshidrogenasa (3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa).	3 β -Hidroxiesteroide NAD (P) oxidoreductasa.
3 α -ol deshidrogenasa (3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa).	3 α -Hidroxiesteroide NAD (P) oxidoreductasa.
17,20 desmolasa	17,20 esteroide liasa.
20,22 desmolasa	20,22 esteroide liasa.
5 α -reductasa	5 α -esteroide: (aceptor) -óxido reductasa.
17 α hidroxilasa	Esteroido NADP reducido: oxígeno, oxidoreductasa. (17 α hidroxilación).
20 α -hidroxilasa	Esteroido NADP reducido: oxidoreductasa.
22-hidroxilasa	Esteroido NADP reducido: oxígeno, oxidoreductasa. (22 hidroxilación).
Δ^4 - Δ^5 isomerasa	3cetoesteroide Δ^4 - Δ^5 isomerasa
17 β Oxidoreductasa	17 β -hidroxiesteroide NAD (P) oxidoreductasa
6 α -hidroxilasa	Esteroido 6 α -hidroxilasa
7 α -hidroxilasa	Esteroido 7 α -hidroxilasa

RESUMEN

Aunque experimentalmente se ha demostrado que los derivados 3α y 3β reducidos de la testosterona, desempeñan un papel determinante en la regulación de diversos procesos fisiológicos normales, y aun en ciertas alteraciones metabólicas, el mecanismo de acción de estos metabolitos no ha sido esclarecido. Con la finalidad de conocer el sitio intracelular de unión específica del 3β -Androstandiol (5α androstano, $3\beta,17\beta$ -diol) en el fibroblasto, en el presente trabajo se realizaron estudios de captación del 3β -diol (usando 3β -Androstandiol- ^3H) en fibroblastos de piel humana mantenidos en cultivo. La retención específica del 3β -Androstandiol- ^3H se determinó inicialmente en monocapas confluentes de fibroblastos intactos. En segundo término se analizó en forma sistemática la unión del compuesto tritiado en fracciones subcelulares purificadas, y se estudió además la especificidad de esta unión. Los resultados obtenidos indican que el 3β -Androstandiol se une preferentemente al compartimento nuclear del fibroblasto.

INTRODUCCION

Las hormonas esteroides son moléculas de naturaleza lipídica, producidas por las glándulas endócrinas y son capaces de influir en el funcionamiento de tejidos distantes que aparentemente no guardan relación con las células que los sintetizaron. Los esteroides son moléculas relativamente pequeñas, que poseen la información suficiente en su estructura para asegurar una respuesta adecuada y específica del órgano blanco sobre el cual actúa (1). Dentro de este tipo de hormonas se agrupan las hormonas sexuales masculinas (llamadas genéricamente andrógenos), las hormonas sexuales femeninas (estrógenos y progestágenos) y las hormonas secretadas por la corteza suprarrenal (corticoesteroides) que incluye a los mineralocorticoides y a los glucocorticoides.

Estos compuestos tienen un peso molecular de alrededor de 300 daltones, y sus estructuras son muy parecidas entre sí, esta similitud se debe a que se originan de un precursor común que es el colesterol. Estructuralmente el colesterol consta de 27 átomos de carbono y su núcleo básico es el ciclopentanoperhidrofenantreno (ver Fig. 1). Todas las hormonas esteroides se sintetizan a partir del colesterol, éste pierde inicialmente la cadena lateral por la acción de enzimas específicas de localización mitocondrial lo que constituye el paso limitante de la esteroidogénesis (2-4). Debido a su propiedad lipofílica y a su tamaño, las hormonas esteroides pueden difundir fácilmente al interior de la célula o bien pasar hacia el torrente sanguíneo. Ya que son altamente específicas, las concentraciones requeridas para que estas hormonas ejerzan su acción son pequeñas, (su concentración en suero es de aproximadamente 10^{-9} moles/l). Una vez secretadas en el torrente sanguíneo, las hormonas esteroides son transportadas por proteínas séricas específicas hacia

los órganos blanco: las más importantes son la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), que une a andrógenos y estrógenos (5,6) y la proteína transportadora de corticoesteroides (CBG o transcortina) a la que se unen corticoesteroides y progestinas (7,8). Algunas especies como la rata no poseen SHBG, sin embargo las hormonas son acarreadas por otras proteínas como la α -fetoproteína y la albúmina, que desempeñan un papel similar (9,10).

Las hormonas esteroides ejercen selectivamente su acción debido a su interacción con receptores intracelulares que se encuentran localizados exclusivamente en los tejidos esteroideos sensibles en donde son captados selectivamente. La retención específica de hormonas esteroides por un tejido blanco fue demostrada en 1962 por E. V. Jensen (11), quien después de administrar a roedores una preparación de estradiol marcado con tritio observó que la hormona era retenida en mayor porción por el tejido uterino. A partir de entonces se ha documentado la existencia de receptores intracelulares específicos de andrógenos (RA), de estrógenos (RE), de progesterona (RP,) y receptores para corticoesteroides, que se encuentran presentes en los tejidos esteroideos sensibles y/o dependientes (12-14). Dentro de la célula blanco, los esteroides son retenidos selectivamente por moléculas receptoras de naturaleza proteica, ubicadas tanto en el citoplasma como en el compartimento nuclear. Una de las propiedades principales de los receptores es, la de ser altamente específicos, esto es, ser capaces de discriminar pequeñas diferencias en la estructura molecular de las hormonas. La unión del esteroide con el receptor se establece mediante enlaces no covalentes con los sitios de unión de alta afinidad de la proteína los cuales generalmente muestran baja capacidad (15).

De acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas se reconocen dos formas básicas del receptor de hormonas esteroides; la forma *nativa* o no disociada, localizada principalmente en el citoplasma, de un peso molecular aproximado de 200 000 daltones y cuyo coeficiente de sedimentación es de 8S en gradientes de densidad de sacarosa (16-18). El complejo formado por la hormona y el receptor es activado (posiblemente por un proceso de desfosforilación) o transformado conformacionalmente, lo cual le confiere la capacidad de ser translocado al núcleo, a donde se une a sitios aceptores situados en la cromatina. Al receptor activado se le conoce como receptor nuclear o forma disociada (4S) del receptor. La interacción del re-

ceptor nuclear con el aceptor resulta en la regulación de la expresión génica de la hormona (19,20).

Biosíntesis de Andrógenos.

Los andrógenos son las hormonas esteroides gonadales que determinan la diferenciación y el desarrollo de los órganos reproductivos masculinos. Regulan además las características sexuales secundarias, la conducta, el comportamiento sexual y la secreción de los órganos sexuales accesorios en el macho. Uno de los andrógenos circulantes biológicamente más activos (la testosterona), es producido en su mayoría por el testículo, aunque su formación por el ovario (21) y la suprarrenal (22) también ha sido informada.

Las células intersticiales del testículo o células de Leydig son las responsables de biosintetizar a la hormona a partir de acetato (23). La regulación de la síntesis de los andrógenos por el testículo se da por un mecanismo de retroalimentación negativa que se establece entre la gónada, el hipotálamo y la hipófisis anterior a través de sus secreciones. Así la hormona liberadora de gonadotropinas (LH-RH) de origen hipotalámico regula la síntesis y/o liberación de la LH (hormona luteinizante u hormona estimulante de las células intersticiales) por la pituitaria anterior; ésta a su vez actúa sobre los receptores membranales de la célula de Leydig resultando en un incremento en la síntesis de testosterona. La biosíntesis de andrógenos se lleva a cabo a partir de colesterol, el cual se encuentra presente en grandes cantidades en la membrana de la célula eucarionte y es sintetizado mediante la unión de moléculas de acetato (24).

Las modificaciones en la molécula de colesterol para llegar a formar los andrógenos se inicia mediante el rompimiento de la cadena lateral, esta reacción es confinada a las mitocondrias de órganos formadores de esteroides, e involucra un rompimiento de carbono a carbono ($C_{21}-C_{22}$). Requiriendo previamente la hidroxilación de los carbonos 20 y 22 del colesterol (25) y es necesaria la presencia de NADPH y oxígeno (26), subsecuentemente la enzima 20,22 desmolasa rompe la cadena lateral del colesterol dihidroxilado, y da como resultado la pregnenolona molécula de 21 átomos de carbono que no tiene actividad hormonal conocida. Ya formada la pregnenolona abandona la mitocondria y se dirige al retículo endoplasmático, en donde tienen lugar las reacciones subsecuentes. La transformación de preg-

nenolona a testosterona requiere de cinco reacciones enzimáticas (Fig. 1); la 17α -hidroxilación mediante la 17α -hidroxilasa, la remoción de la cadena lateral mediante la $17,20$ desmolasa, la oxidación del grupo hidroxilo en posición 3 y el cambio de la doble ligadura de Δ^5 a Δ^4 mediante la acción de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y la Δ^4 - Δ^5 isomerasa, este par de enzimas se encuentran íntimamente asociadas y las 2 reacciones ocurren casi simultáneamente. Por último es necesaria la reducción del oxígeno en el carbono 17 mediante la acción de la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

Las principales vías metabólicas para la formación de testosterona a partir de pregnenolona se muestran en la figura 1. La ruta de los delta 5 (Δ^5) opera para el humano y el perro, mientras que la llamada vía de los delta 4 (Δ^4) se sigue en el testículo de la rata.

Metabolismo de Testosterona.

La testosterona una vez sintetizada, se vierte a la circulación de donde será captada por la célula blanco. Esta hormona presenta actividad androgénica *per se* y actúa a nivel celular o bien es convertida enzimáticamente en los tejidos andrógeno dependientes a un compuesto cuya actividad biológica es inclusive superior al compuesto original; por ejemplo, la testosterona es convertida en el epitelio prostático a 5α -dihidrotestosterona (27) por la acción de la enzima 5α -reductasa NADPH dependiente (28, 29) de localización microsomal y/o nuclear.

La formación de la 5α -dihidrotestosterona (5α -DHT) a partir de testosterona ocurre en varios tejidos en los que se sugiere que esta hormona ejerce su acción. Así la testosterona es convertida a 5α -DHT en el epidídimo (30), cerebelo (31), hipotálamo (32), hipófisis an-

Fig. 1 Síntesis de Testosterona en Testículo.

La conversión de colesterol a pregnenolona se lleva a cabo en las mitocondrias de las células formadoras de esteroides. Las reacciones subsecuentes ocurren en el retículo endoplásmico liso. Las reacciones de la izquierda indican la ruta de los Δ^4 y las de la derecha indican la ruta de los Δ^5 . Los números arábigos indican las enzimas involucradas en el proceso de biosíntesis. 1) 20α hidroxilasa; 2) $22R$ hidroxilasa; 3) $20,22$ desmolasa; 4) 3β hidroxiesteroide deshidrogenasa; 5) Δ^4 - Δ^5 isomerasa; 6) 17α hidroxilasa; 7) $17,20$ desmolasa 8) 17β oxidoreductasa.

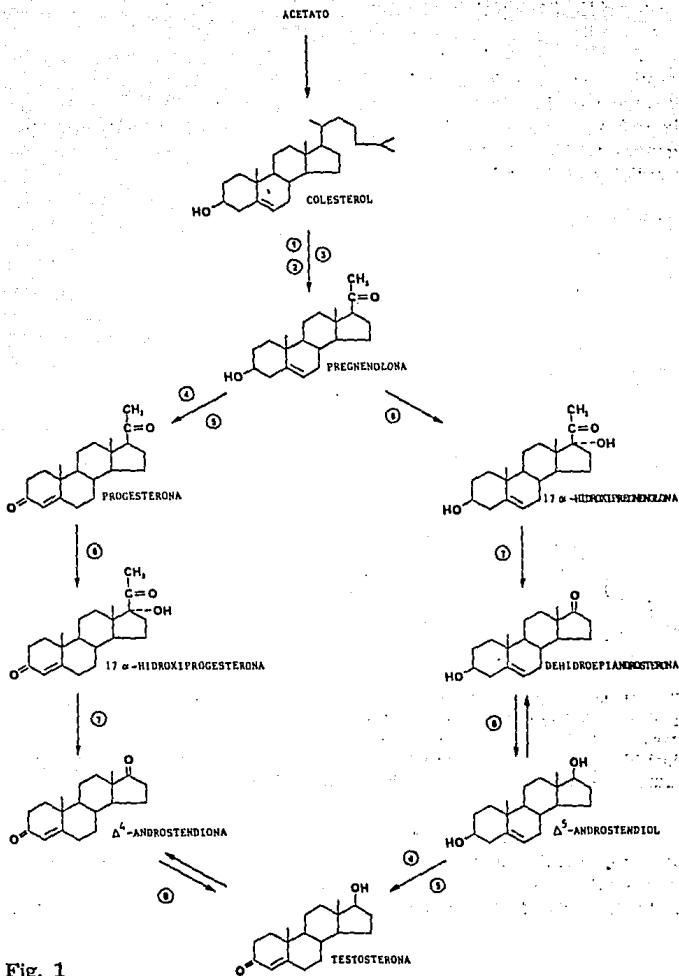


Fig. 1

terior (33, 34), piel y glándula sebácea (35-37) de la mayoría de los mamíferos.

Por otra parte la gran mayoría de efectos androgénicos a nivel celular son mediados por la acción de la 5α -DHT. Este compuesto es reducido enzimáticamente (figura 2) en el grupo cetónico del carbono 3 mediante la acción de la 3α - y la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y esto resulta en la formación de los compuestos 3α -androstadiol y el 3β -androstadiol.

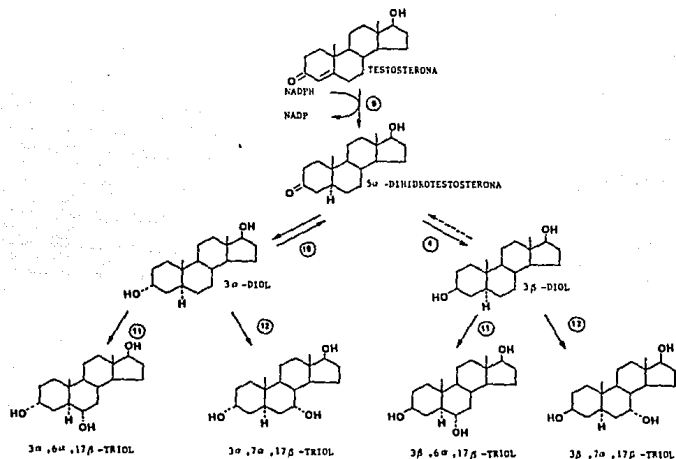
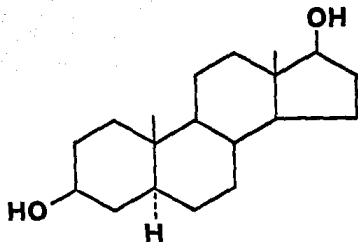


Fig. 2. Metabolismo de Testosterona en órgano blanco. Los números arábigos indican las enzimas involucradas en las reacciones de conversión de la testosterona a sus metabolitos. 4) 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 9) 5α -esteroide reductasa 10) 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa 11) 6α -esteroide hidroxilasa 12) 7α -esteroide hidroxilasa.

La formación del 3β -androstadiol que es el compuesto objeto del presente estudio (Fig. 3) se lleva a cabo principalmente en la fracción soluble y en la fracción microsomal de la célula que es donde se ha identificado la mayor actividad de la 3β -hidroxiesteroide des-



5 α -ANDROSTANO-3 β -17 β DIOL
(3 β -diol)

Fig. 3. Estructura química del 3 β -diol
5 α - ANDROSTANO- 3 β , 17 β DIOL
(3 β -diol)

hidrogenasa. Aunque las características de esta enzima han sido escasamente estudiadas se sabe que exhibe su mayor actividad a un pH de entre 5-7 y a una temperatura óptima de 37°C (38). Como se indica en el cuadro número 1, la formación del 3 β -androstadiol (3 β -diol) se ha reportado que ocurre en varios tejidos como por ejemplo la próstata ventral, en hipófisis, piel, túbulo seminífero y en hipotálamo de rata. Finalmente el destino metabólico del 3 β -diol y su isómero el 3 α -diol (Fig. 2) es la hidroxilación de los carbonos 6 y/o 7 en orientación alfa y beta para ser excretados. Estos productos son biológicamente inertes y se cree que su formación es un reflejo de la actividad metabólica celular (44).

Concentración del 3 β Androstadiol.

Se ha sugerido reiteradamente, aunque sin comprobación experimental, que el 3 β -diol es un andrógeno biológicamente débil y que por lo tanto no es importante fisiológicamente (45), sin embargo, estas afirmaciones han sido cuestionadas y su importancia fisiológica revalorada, gracias, al desarrollo de técnicas analíticas de cuantificación. En el cuadro número 2 se muestran las concentraciones del

Cuadro No. 1

<i>Metabolismo (Sustrato Producto)</i>	<i>Tejido</i>	<i>Método de se- paración de metabolitos</i>	<i>Ref.</i>
T → 3β diol	Próstata de rata.	Cromatografía en capa fina.	39
T → 3β diol	Células tumorales de pituitaria de rata (GH ₃).	Cromatografía en papel	40
T → 3β diol	Piel de cuero ca- belludo.	Cromatografía en capa fina.	41
T → 3β diol	Piel de espalda.	Cromatografía en capa fina.	41
5α DHT → 3β diol	Pituitaria, hipotá- lamo y túbulo se- minífero (rata).	Cromatografía en papel y capa fina.	42
Δ ⁴ A → 3β diol	Glándula sebácea de Gerbo	Cromatografía en capa fina.	43
T → 3β diol	"	"	43

Formación del 3β diol en tejidos sensibles a andrógenos.

Los estudios se realizaron in vitro, partiendo de un precursor marcado radiactivamente.

T: Testosterona, 3β diol: 5α androstano-3β, 17β diol, 5α DHT:
5α Dihidrotestosterona, Δ⁴ A: Δ⁴ Androstendiona.

3β-diol en sujetos normales, y en individuos cuya patología es atribuida a la acción del androstandiol. Así, en el hombre, la concentración plasmática del 3β-diol es mucho mayor a la encontrada en la mujer, mientras que en el varón castrado, los niveles de la hormona se encuentran disminuidos lo que sugiere que el testículo aporta un porcentaje importante del esteroide. Por otro lado, se observó que la concentración plasmática del 3β-diol en mujeres hirsutas es similar al de los hombres normales lo cual sugiere que esta alteración es

debida a los niveles elevados de este metabolito (45). Las altas concentraciones del 3β -diol encontradas en la hipófisis anterior de la rata sugieren que este compuesto es sintetizado y de alguna forma retenido por el tejido (46) ya que se han detectado niveles tisulares 4 veces superiores a los séricos (aproximadamente 1 ng/g de tejido).

Efectos Biológicos del 3β -Androstandiol.

Como se mencionó con anterioridad el destino metabólico de un producto de conversión formado a partir de una hormona activa, puede seguir dos caminos; uno que estos productos (metabolitos) sean activos biológicamente o bien que sean inactivos y pueden:

- a) inducir un recambio de la hormona esteroide
- b) regular las concentraciones intracelulares de hormona activa
- c) cambiar el balance metabólico celular.

En el caso particular del 3β -diol que se puede considerar es un metabolito activo ya que se han registrado varios efectos biológicos de este compuesto. Por ejemplo, en estudios metabólicos tanto *in vitro* como *in vivo* se ha demostrado la formación del 3β -diol en la fracción microsomal de próstata ventral de la rata (47) y en perfusiones de la próstata del perro (48). Al estudiar la acción de este metabolito sobre la próstata de rata se observa un marcado efecto sobre el componente epitelial en términos de inducción de actividad secretora y el mantenimiento de la altura y tamaño de las células epiteliales (49), este efecto es debido al 3β -diol y no a su epímero 3α o a la 5α -DHT. Ya que el 3β -diol es capaz de mantener la actividad y morfología de la próstata, Robel y col. sugirieron que este metabolito regula la actividad de la 5α -DHT inhibiendo su expresión (50). Por otro lado, con el antecedente de que un efecto androgénico temprano sobre el tejido prostático es un incremento en la actividad de la RNA polimerasa, Davies y col. estudiaron el efecto del 3β -diol sobre la actividad de esta enzima, y observaron que induce su actividad demostrando así su efecto androgénico intrínseco (51).

Otro efecto fisiológico en el cual parece estar involucrado el 3β -diol es el inicio de la pubertad en los roedores. De acuerdo a la información disponible se sabe que en esta etapa de maduración los cambios en las gónadas, tracto reproductivos, encéfalo e hipófisis son iniciados en respuesta a un estímulo hormonal apropiado (52). En

Cuadro No. 2

<i>Esteroides cuantificados</i>	<i>Individuos estudiados</i>	<i>Método de Análisis</i>	<i>Concentración en plasma periférico</i>	<i>Ref.</i>
3 β diol	Hombres normales	Radioinmunoensayo	609 pg/ml	48
3 β diol	Mujeres normales	Radioinmunoensayo	285 pg/ml	48
3 β diol	Hombres adultos castrados	Radioinmunoensayo	200 pg/ml	48
3 β diol	Fluido folicular humano	Radioinmunoensayo	725 pg/ml	48
3 β diol	Mujeres hirsutas	Radioinmunoensayo	585 pg/ml	48

esta especie se ha correlacionado el inicio de la pubertad con un incremento en la secreción hormonal por parte de la gónada (53), aunque se ha reconocido que no sólo el estradiol (E_2) y la progesterona están involucrados en la activación del hipotálamo.

A este respecto Eckstein ha estudiado en la rata hembra la relación del 3β -diol con el inicio de la pubertad (54), sus datos indican que la administración de 3β -diol, induce cambios similares a los observados en el inicio de este fenómeno fisiológico; esto es, apertura vaginal y la aparición del primer estro.

En la rata, en etapas prepuberales la producción del 3α -diol por el ovario y el testículo se encuentra incrementada, sin embargo, este isómero no tiene efecto alguno sobre el adelanto de la pubertad (54), lo que ha sugerido que la hormona hipofisaria FSH activa ciertas epimerasas que convierten a la forma 3β del androstandiol, que es biológicamente activo (55).

Estos hallazgos sugieren fuertemente que el metabolito tetrahidro reducido de la testosterona está involucrado directamente en la iniciación de la pubertad.

Se sabe que los andrógenos regulan el desarrollo y la actividad secretora de las glándulas sebáceas (56).

La testosterona y/o sus metabolitos actúan sinérgicamente con hormonas hipofisarias como la prolactina y la somatotropina para mantener su actividad (57-58).

Estudios realizados por Ebling y col. demostraron también que el 3β -diol es capaz de incrementar la producción de sebo y aumentar el número de mitosis en las glándulas sebáceas así como inducir su crecimiento (59) en ratas hipofisectomizadas y castradas. Estos cambios pudieron ser observados a dosis extremadamente bajas del 3β -diol (0.2 mg) y en estos animales, el peso de las vesículas seminales y la próstata ventral aumentó, indicando que los órganos mencionados, son también sensibles a la acción del 3β -diol (59). Por último, el efecto del 3β -diol sobre la secreción y liberación de gonadotropinas, es aun controversial (60, 61). Los efectos observados posiblemente dependen de la vía de administración, dosis empleada y otros parámetros experimentales, así se ha reportado la potencia antigonadotrópica del 3β -diol bajo ciertas condiciones de experimentación, pero en otras este efecto está ausente (62,63). También es posible que después de la administración del 3β -diol este sea convertido enzimáticamente a 5α -DHT y/o 3α - por tejidos neurales (44).

Mecanismo de Acción del 3 β -Androstandiol.

En la actualidad se desconoce el mecanismo de acción de los andrógenos 5 α - reducidos a nivel celular, en particular del 3 β -diol. Estudios efectuados por Thieulant y col. indicaron que en la hipófisis anterior de la rata, existe una macromolécula de naturaleza proteica capaz de unir al 5 α -androstano-3 β ,17 β -diol (64). Por análisis de especificidad y afinidad, el 3 β -diol parecía unirse al receptor de estradiol, estos resultados han sido confirmados por Rochefort y García en el útero de la ternera y la rata (65). Aún más, el 3 β -diol es capaz de estimular *in vivo* la actividad de la RNA polimerasa en la pituitaria, estimula también a la timidina-cinasa e induce la síntesis del receptor de progesterona en células MCF-7 (66), respuestas consideradas típicamente estrogénicas. Por otra parte el 3 β -diol es capaz de interaccionar con el receptor de andrógenos, por desplazar a la hormona de su sitio de unión, Hannouche y col. (67) y Barley y col. (68) demostraron que el 3 β -diol interfiere con la unión de la testosterona y 5 α -DHT a su receptor, en la pituitaria y cerebro.

Finalmente Baulieu encontró que el 5 α -androstano-3 β ,17 β diol 3 H se une con gran afinidad a una macromolécula que sedimenta en la región 3-4S (47).

En resumen con los datos disponibles actualmente no se ha podido esclarecer, ni aun, sugerir un modelo de acción específico para el 3 β -diol a nivel celular. En este estudio se pretende analizar en forma sistemática la acción del 3 β -Androstandiol en el fibroblasto humano.

Fibroblastos como modelo biológico en el estudio de receptores citoplasmáticos.

El uso de fibroblastos derivados de piel, mantenidos en cultivo en monocapa, es de gran utilidad para el estudio del mecanismo de acción de andrógenos ya que mantienen las características del órgano blanco del cual provienen, en la capacidad de metabolizar esteroides (69) y poseen además receptores específicos. Hasta ahora los receptores que se han encontrado y estudiado en fibroblastos son los de andrógenos (70,71) y los de glucocorticoides (72), pero no de estrógenos ni de progesterona. Por otro lado el uso de fibroblastos permite tener un modelo biológico homogéneo, con un solo tipo celular, y lo más importante es que se evita la presencia de

contaminantes, por ejemplo proteínas séricas que podrían enmascarar la actividad de receptores de un tejido específico.

Además, dado que los fibroblastos se pueden obtener en grandes cantidades y es posible almacenarlos a bajas temperaturas durante tiempos indefinidos, dan a este modelo biológico una gran ventaja sobre otros tejidos provenientes de animales de experimentación.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

El objetivo del presente estudio fue el de investigar la unión específica del 5α -androstano- $3\beta,17\beta$ diol a fibroblastos provenientes de piel genital, caracterizar esta unión y tratar de establecer un posible mecanismo de acción a nivel celular.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL:

Reactivos para cultivo celular:

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Laboratorios Gibco, NY.

Medio mínimo esencial de Eagle (MEM); penicilina, estreptomina liofilizada con 10,000 U/ml de penicilina base y 10 mg/ml de estreptomina base; solución de tripsina-EDTA (1x) liofilizada, 0.5 g tripsina (1:250) 0.2 g de EDTA/l de solución balanceada de Hanks, sin calcio y sin magnesio; solución de aminoácidos no esenciales 10 mM (100x); suero fetal de ternera; solución balanceada de fosfatos de Dulbecco (PBS).

Reactivos:

Los reactivos utilizados en el desarrollo de este trabajo fueron de alto grado de pureza y se compraron a J. T. Baker y Sigma. El agua utilizada fue desionizada mediante el sistema Milli-Q, Water Purification System de Millipore.

Compuestos marcados con isótopos radiactivos:

(1,2,4,5,6,7,³-H) 5 α DHT, a.e. 123 Ci/mmola; (1,2,³-H) 3 β ,5 α androstandiol, a.e. 40 Ci/mmola, se obtuvieron de Amersham International, Reino Unido.

Compuestos radioinertes:

3 β , 5 α androstandiol, 5 α dihidrotestosterona, estradiol, 3 β , 5 α no-retisterona se obtuvieron de Sigma y Steraloids Inc. E.U., y se purifi-

caron mediante 3 recristalizaciones consecutivas, usando metanol como disolvente, y como criterio de pureza se midió su punto de fusión en un determinador de punto de fusión Mettler FP 61.

Limpieza de material:

Todo el material utilizado en cultivo celular se lavó con jabón haemo-sol (haemo-sol Inc. MA), se enjuagó 10 veces con agua de la llave, 10 veces con agua destilada y 10 veces con agua desionizada, se hirvió con agua desionizada, se secó a 150°C durante 30 minutos y se envolvió para ser esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 15 Lbs. de presión.

M E T O D O S

Cultivo de Células:

Las células utilizadas en este trabajo se obtuvieron a partir de piel de prepucio obtenida durante la circuncisión de individuos normales. La piel se sembró en botellas de cultivo desechables de 25 cm² utilizando 5 ml de MEM-20% (Medio Mínimo Esencial Eagle pH 7.4 adicionado con tricine 20 mM, bicarbonato de sodio 20 mM, aminoácidos no esenciales (Apéndice 1) 1%, antibióticos y suero fetal de ternera 20%). Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera con 95% de aire y 5% CO₂. Una vez que se logró la confluencia celular (3-4 semanas), el cultivo se fraccionó en varios subcultivos. Para la resiembra las células se separaron de botellas de cultivo mediante tripsinización: las células se lavaron 2 veces con 5 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS, Apéndice 2) y se incubaron con 2 ml de tripsina a 37°C durante 3 minutos, las células se separaron mediante agitación y la suspensión celular se transfirió a 2 botellas con 10 ml de MEM-10%. Los subcultivos se efectuaron para obtener células y experimentar en ellas, o bien se almacenaron a -70°C.

Congelamiento celular:

Con el fin de conservar las células por periodos de hasta 2 o 3 años, sin necesidad de utilizar espacio y reactivos en el laboratorio de cultivo celular, las células fueron congeladas, para lo cual se usa-

ron cultivos confluentes. Las células se despegaron de sus botellas por el procedimiento de tripsinización previamente descrito. La suspensión celular se centrifugó a 3000 rpm a 4°C durante 3 minutos, el paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio (MEM, antibióticos, suero fetal de ternera al 10%, glicerol al 10%, pH 7.4) y se transfirieron a frascos de vidrio de 2.2 ml de capacidad. El proceso de congelamiento se realizó en forma gradual con la finalidad de evitar daño y/o muerte celular (refrigeración 30 minutos, congelación a -20°C durante 60 min. y posteriormente a -70°C, en la cual las células fueron almacenadas).

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

A. *Estudio de la unión del 3 β -Androstandiol en fibroblastos completos:*

Para este estudio los fibroblastos humanos normales mantenidos en cultivo, se sembraron en botellas cilíndricas de vidrio (Wheaton USA) de 690 cm² de superficie. El inóculo inicial fue de 5x10⁶ células y se añadieron 100 ml de MEM-10%. Las botellas se gasearon con una mezcla de aire y CO₂ (95%-5%) durante 2 minutos, se cerraron herméticamente, y se incubaron a 37°C con rotación (Bellco Glass Inc. New Jersey modelo 3032) a una velocidad de 0.2 rpm durante 24 h, posteriormente se aumentó la velocidad a 0.5 rpm. El medio de cultivo se reemplazó el tercer día con 100 ml de MEM-10%. En el sexto día se reemplazó nuevamente el medio con 50 ml de medio de cultivo MEM sin SFT, (con el fin de eliminar esteroides endógenos contenidos en el suero). En el séptimo día, las células se lavaron 2 veces con 50 ml de PBS, se desprendieron por tripsinización y la suspensión celular se colocó en tubos con 3 ml de inhibidor de tripsina (Sigma tipo 11-L de frijol). La suspensión celular se centrifugó a 3000 rpm (Rotor Beckman JA 20, r max 108 mm) a temperatura ambiente durante 5 minutos, el precipitado se resuspendió en 5 ml de MEM y se centrifugó en las mismas condiciones. El botón celular se resuspendió en MEM y se contaron las células en una cámara de Neubauer (Proper Manufacturing Co., New York). Los fibroblastos preparados según se acaba de describir se incubaron con 3 β diol-³H solo o con un exceso de diferentes esteroides radioinertes (3 β -diol⁰, DHT⁰, 3 β -NET⁰, T⁰, E⁰,) a 37°C durante 45 minutos. Al finalizar la incubación, la suspensión celular se colocó en hielo y se le agregaron 6 ml de solución tris-salina (tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 0.9%),

los tubos se centrifugaron a 3000 rpm (Rotor Beckman JA 20.1 r max 115 mm) a 4°C durante 5 minutos. El paquete celular se lavó 2 veces con 3 ml de solución tris-salina y finalmente las células se resuspendieron en 1 ml de agua desionizada y se rompieron con 2 pulsos de 10 seg. de ultrasonido a una temperatura de 4°C (Sonicador Heat System Ultrasonic Inc. Modelo W-220 F). Del sonicado se tomaron alícuotas de 50 μ l por triplicado para la cuantificación de proteínas de acuerdo al método de Bradford (73, Apéndice 3). Alícuotas de 100 μ l por triplicado se usaron para medir radiactividad, empleando Insta-gel como líquido de centelleo (Packard United Technologies E.U.). Las muestras se contaron durante 1 minuto en un contador de centelleo líquido (Packard Tri-carb modelo 2660) y se restó el fondo del primer vial, usado como blanco, en el cual se colocó líquido de centelleo y 100 μ l de agua.

B. Estudio de la unión del 3 β -Androstandiol en citosol:

Con la finalidad de conocer si la retención del 3 β -diol dentro de la célula era a nivel citoplásmico, se realizó un estudio de unión de hormona marcada, y para separar la fracción libre de la unida se emplearon gradientes de sacarosa sometidos a ultracentrifugación. Para cumplir este objetivo, las células normales se sembraron en botellas cilíndricas y 24 h antes del experimento se les cambió el medio a MEM sin suero, el día del experimento se tripsinizaron, lavaron e incubaron con los esteroides radiactivos con o sin esteroide radioinerte. Al finalizar la incubación, el paquete celular se lavó 3 veces con solución tris-salina centrifugando a 3000 rpm (Rotor Beckman JA 20.1) a 4°C durante 5 minutos. El paquete celular restante se resuspendió en 0.5 ml de TEDT (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, EDTA 1.5 mM Ditiotreitól [DTT] 0.25 mM, Trasylol [Bayer] 5000 U/ml) y se homogenizó en un homogenador de vidrio con pistilo de teflón a 4°C. Los homogenados se centrifugaron a 30,000 rpm (Rotor Beckman SW 50.1 r max 107.3 mm) 1 hr. a 2°C, del sobrenadante (citosol) se tomaron alícuotas de 50 μ l para cuantificar proteínas y alícuotas de 400 μ l que se depositaron sobre gradientes lineales de sacarosa del 5 al 20%.

Los gradientes se prepararon en solución amortiguadora tris-HCl 20 mM, pH 7.4, EDTA 1.5 mM, DTT 0.25 mM, glicerol 10% v/v, por medio de un formador de gradientes (Buchler Instruments USA)

en tubos de polialómero de 5.1 ml de capacidad. Los gradientes se centrifugaron a 50,000 rpm (Rotor Beckman SW 50.1) durante 18 h. a 2°C. Al terminar la centrifugación, los gradientes se fraccionaron a partir del fondo (Fraccionador Beckman Recovery System USA), en fracciones de 5 gotas que se depositaron en frascos a los cuales se les adicionó 5 ml de líquido de centelleo Insta-gel, y se cuantificó la radiactividad (83).

C. *Estudio de la unión del 3 β -Androstandiol a nivel subcelular:*

Se obtuvieron fibroblastos por el método de cultivo de células, los cuales posteriormente fueron separados de las botellas de cultivo mediante el método de tripsinización y fueron incubados con el 3 β -diol ^3H más del 3 β -diol radioinerte durante 60 min. a 37°C. Posterior a la incubación el botón celular fue lavado 3 veces con solución tris-salina. Los fibroblastos se sonicaron 3 veces a 4°C durante 10 seg. cada vez (Sonicador Heat System Ultrasonic Inc Modelo W-220 F), posteriormente se obtuvieron las fracciones subcelulares por centrifugación diferencial de acuerdo al método de Schneider y Hogeboom (75), figura No. 4. Una vez que se obtuvieron las fracciones subcelulares se resuspendieron y se tomaron alicuotas de cada una de ellas para cuantificar radiactividad y concentración de proteínas (73, Apéndice 3).

D. *Estudio de la unión del 3 β -Androstandiol a nivel nuclear:*

Una vez efectuados los estudios a nivel subcelular se observó que la mayor captación de radiactividad se encontraba en el núcleo, por lo que se estudió la incorporación del esteroide en este organelo celular. Para este propósito se obtuvieron fibroblastos por la técnica de cultivo de células, los cuales fueron separados por tripsinización, e incubados con el esteroide a estudiar. Obtención de núcleos: el paquete celular se resuspendió en 3 ml de solución isotónica (tris-base 20 mM pH 7.4 a 4°C, sacarosa 0.32 M, MgCl_2 1 mM), y se centrifugó durante 5 min. a 3000 rpm a 4°C. El paquete celular se resuspendió en 4.2 ml de solución hipotónica (tris-base 20 mM pH 7.4 a 4°C, MgCl_2 1 mM) y se dejó en reposo durante 15 minutos, al término de los cuales los fibroblastos se rompieron pasándolos a través de una aguja hipodérmica del No. 25. A la suspensión obtenida se le adicionó 0.6 ml de solución hipertónica (tris-base 20 mM pH 7.4

a 4°C, sacarosa 2.2. M, MgCl₂ 0.5 mM, CaCl₂ 1 mM) con lo que la suspensión fue llevada a una condición de isotonicidad. El lisado se centrifugó a 2400 rpm durante 20 min. a 4°C. Del sobrenadante se tomaron alicuotas de 100 µl por triplicado para cuantificar radiactividad. El precipitado que contiene los núcleos fue resuspendido en 3 ml de buffer isotónico. Se centrifugó nuevamente a 2400 rpm por 20 min. a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado nuclear se resuspendió en 500 µl de agua desionizada y se sonicó 2 veces durante 10 seg. para romper los núcleos. Del sonicado nuclear se tomaron alicuotas de 100 µl por triplicado y se colocaron en frascos con 5 ml de líquido de centelleo insta-gel y se contaron durante 1 minuto en un contador de centelleo líquido. Se tomaron alicuotas de 100 µl para la cuantificación de ADN empleando el método de Santoianni y Ayala (76, Apéndice 4). Todo este procedimiento fue empleado también para estudiar la captación nuclear del 3β-diol a diferentes tiempos.

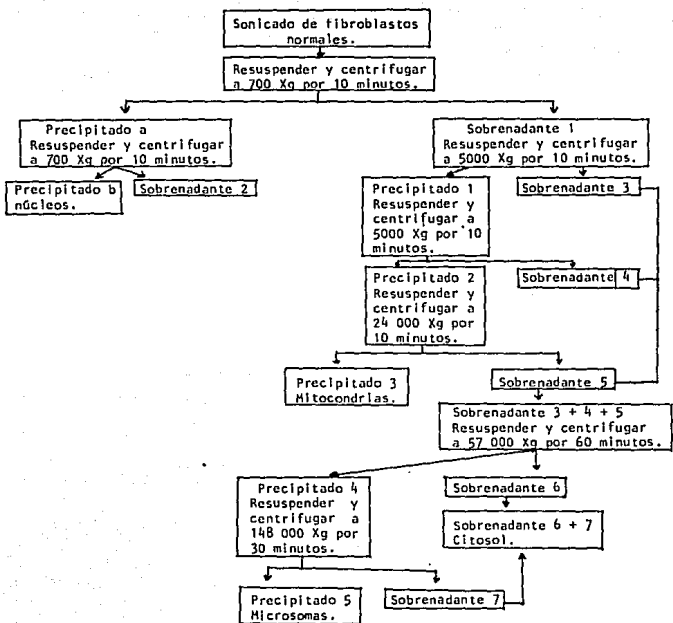


Fig. 4 Aislamiento de fracciones subcelulares por centrifugación diferencial.
Método de Schneider y Hogeboom (75).

RESULTADOS

Influencia de Diferentes Concentraciones del 3 β -diol radioinerte en la captación total de radiactividad.

Con el fin de estudiar la captación total del 3 β -diol en fibroblastos humanos normales (Fig. 5), las células se incubaron con 3 β -diol tritiado (3 β^*), en este ensayo se observó que los fibroblastos son capaces de retener el esteroide intracelularmente. Al agregar excesos de esteroide radioinerte entre 6 a 150 nM, la captación no se ve alterada. Sin embargo se observa que al aumentar la concentración a 300 nM del 3 β -diol radioinerte, existe un incremento en la captación, llegando a su máximo (66000 dpm/mg de proteína) a concentraciones de 750 nM y este incremento en la captación no se mantiene, ya que al aumentar la concentración hasta 1500 nM, se observa que la captación de radiactividad no sufre modificaciones considerables con respecto a los fibroblastos incubados únicamente con la hormona marcada (3 β^*) (Fig. 5).

Especificidad de Unión:

Con el objeto de saber si el aumento de captación de 3 β -diol ^3H en los fibroblastos es producido exclusivamente por la adición del 3 β -diol radioinerte (750 nM), las células se incubaron con 3 β -diol ^3H más 3 β -diol radioinerte a una concentración de 750 nM y además se probaron otros esteroides radioinertes incubándolos con 3 β -diol ^3H en concentraciones similares. Como se observa en la figura 6, ni el estradiol, que es un compuesto aromático con una configuración muy parecida al 3 β -diol, ni la 5 α -DHT que es su precursor metabólico inmediato, lograron mimetizar la acción del 3 β -diol radioinerte. Por otra parte, fue necesario comprobar la especificidad de

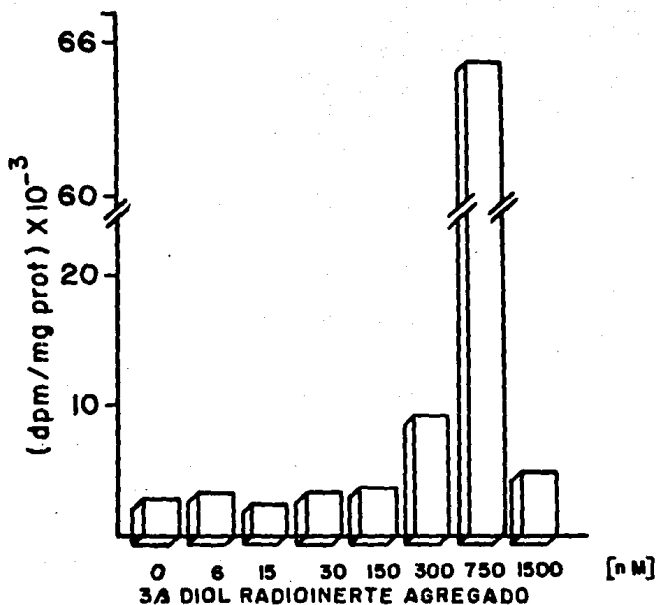


Fig. 5 Influencia de diferentes concentraciones del 3β -diol radioinerte en la captación total de radiactividad por fibroblastos. Las células se incubaron en 3 ml de MEM conteniendo 3β -diol ^3H 3 nM solo o con diferentes concentraciones de 3β -diol radioinerte, los cuales se indican en la parte inferior de las barras. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 45 minutos. Estos resultados son promedio de 2 experimentos efectuados por separado.

esta unión empleando un esteroide radiactivo diferente al 3β -diol, para lo cual se corrieron experimentos de unión con 5α -DHT ^3H en fibroblastos completos. Como se observa en la figura 7, aunque la 5α -DHT ^3H es retenida en mayor concentración que el 3β -diol ^3H , al añadir 3β -diol radioinerte, la concentración de esteroide retenido no es alterada, mientras que en la incubación con 3β -diol ^3H la cap-

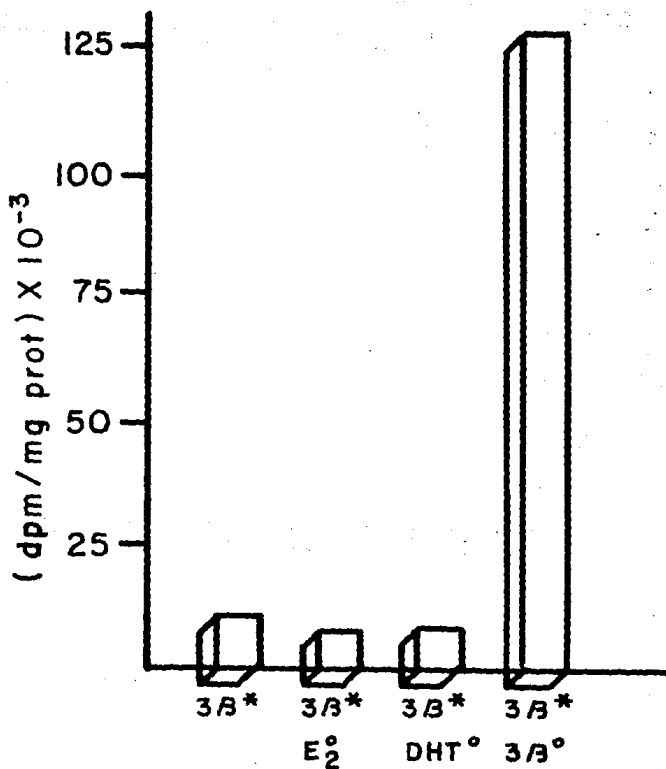


Fig. 6. Especificidad de Unión del 3β -diol en células completas. Fibroblastos derivados de piel de individuos normales se incubaron en 3 ml de MEM conteniendo 3β -diol ^3H 3 nM ($3\beta^*$) solo o con hormona no marcada a una concentración de 600 nM Estradiol = E_2^o , Dihidrotestosterona = DHT^o , 3β -diol = $3\beta^o$) a 37°C durante 45 minutos. Las células se trataron posteriormente como se indica en material y métodos. Estos resultados son representativos de 3 experimentos efectuados por separado.

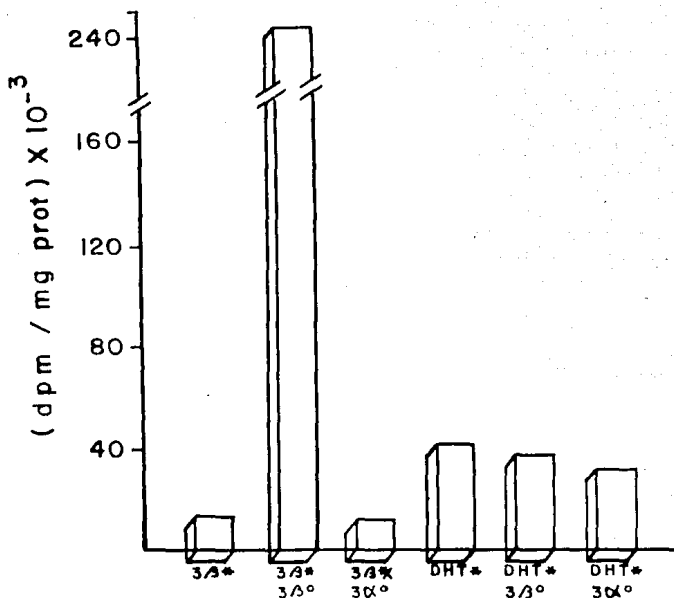


Fig. 7 Estudio del efecto del 3β-diol radioinerte en la captación total de 3β-diol radiactivo.

Los fibroblastos fueron incubados en 3 ml de MEM conteniendo 3β-diol ³H 3 nM solo o en presencia de 3β-diol o 3α-diol radioinertes, en una concentración de 750 nM, o bien con DHT ³H 2 nM con o sin 3β-diol o 3α-diol radioinertes en una concentración de 750 nM. Los resultados se indican como radiactividad total unida por mg de proteína.

tación se incrementa considerablemente. En este estudio también se probó la influencia del 3α-diol radioinerte, el cual no modificó la captación ni del 3β-diol ³H ni de la 5α-DHT ³H.

Otro estudio para comprobar la especificidad del fenómeno del incremento de captación propiciado por altas concentraciones de 3β-diol

fue realizado con un compuesto parecido al 3β -diol, el 3β -diol de Noretisterona (3β -NET). El 3β -NET difiere del 3β -diol natural en que posee un radical etinilo en el carbono 17 y carece del metilo en posición 19. Como se muestra en la figura 8 el 3β -NET es capaz de mimetizar la propiedad del 3β -diol natural de aumentar la captación de radiactividad. En este estudio se incubó 3β -diol ^3H + excesos de

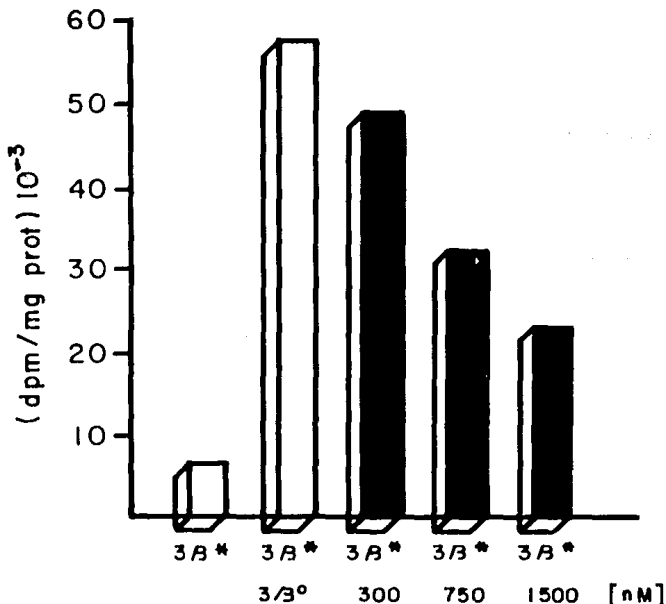


Fig. 8 Estudio del efecto de 3β -NET radioinerte en la captación total de 3β -diol radiactivo. Los fibroblastos se incubaron en 3 ml de MEM conteniendo 3β -diol ^3H ($3\beta^*$) 3 nM con o sin un exceso de esteroide radioinerte, 3β -diol ^3H ($3\beta^{\circ}$) en un exceso de 250 veces y 3β -NET en un exceso de 100, 250 y 500 veces.

300 nM, 750 nM, 1500 nM de 3β -NET y en las tres concentraciones este compuesto sintético aumentó la captación del 3β -diol ^3H natural, aunque a concentraciones de 1500 nM la captación fue menor como sucede con el 3β -diol natural (Fig. 8).

Unión del 3β -diol a Nivel Citoplasmático:

Ya que las hormonas esteroideas para ejercer su acción se unen a una macromolécula de naturaleza proteica, de localización citoplasmática (85), se estudió la posible unión del 3β -diol a una proteína citosólica. Para este fin, el citosol de los fibroblastos incubados con 3β -diol ^3H solo y 3β -diol ^3H + 3β -diol radioinerte en una concentración de 600 nM se sometieron a ultracentrifugación en gradientes de sacarosa de 5 a 20%. Como control positivo de unión a una macromolécula citosólica se empleó citosol de células incubadas con 5α -DHT ^3H , 2 nM el cual se trató en forma similar. Los resultados mostraron que la radiactividad se mantiene en un nivel basal a través de todo el gradiente (Fig. 9 círculos cerrados), no así en el control incubado con 5α -DHT ^3H en el cual se perfila un pico de mayor radiactividad con un coeficiente de sedimentación de 8S (Fig. 9 círculos abiertos) indicando que la 5α -DHT sí se une a una proteína citosólica y el 3β -diol no.

Estudios a nivel subcelular de la captación del 3β -diol

Una vez comprobado el fenómeno de alta retención de 3β -diol ^3H al incubarse específicamente con exceso de 3β -diol radioinerte, y al no encontrar unión a nivel citoplasmático, se efectuaron estudios a nivel subcelular con el objeto de conocer en que estructura celular ocurre esta retención. Para este propósito los fibroblastos se incubaron con 3β -diol ^3H 3 nM + 3β -diol radioinerte 600 nM durante 60 min. a 37°C , posteriormente se separaron fracciones subcelulares mediante centrifugaciones sucesivas, y en cada fracción se cuantificó la radiactividad incorporada. Los resultados indicaron (Fig. 10) que la mayor captación se efectuó, en el núcleo celular, incorporándose el 80% de la radiactividad total unida a la célula intacta, en mitocondrias y citosol la captación fue menor de un 10% y en microsomas sólo fue de un 2%, indicando que el núcleo es el componente celular responsable de la captación del esteroide.

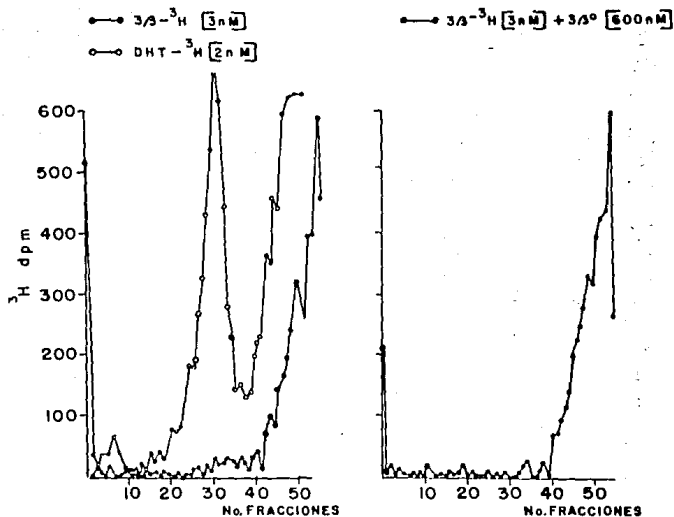


Fig. 9 Perfil de sedimentación del citosol de fibroblastos incubados con 3β -androstano- ^3H .

Fibroblastos mantenidos en cultivo se incubaron con 3β -androstano- ^3H (Panel izquierdo) o bien con 3β -androstano- ^3H + 3β -androstano- ^3H radioinerte (Panel derecho). Alicuotas de la fracción soluble (500 μl) de los fibroblastos incubados, fueron centrifugados xg a 4°C . El citosol de fibroblastos incubados con 5α -DHT ^3H en las gradientes de densidad de sacarosa (5-20%) por 18 h. a 300,000 mismas condiciones se usó como control (Panel izquierdo).

Cinética de Unión del 3β -diol ^3H a fibroblastos

Se estudió la captación del 3β -diol a fibroblastos humanos, para ello los fibroblastos se incubaron con 3β -diol ^3H más 3β -diol radioinerte 600 nM a 37°C , durante intervalos de tiempo de 5, 15, 30, 45 y 60 minutos, analizando la radiactividad incorporada tanto en núcleos como en citosol. Como se muestra en la figura 11, a los 5 min., la captación en núcleos del 3β -diol ^3H fue la más alta, y al incremen-

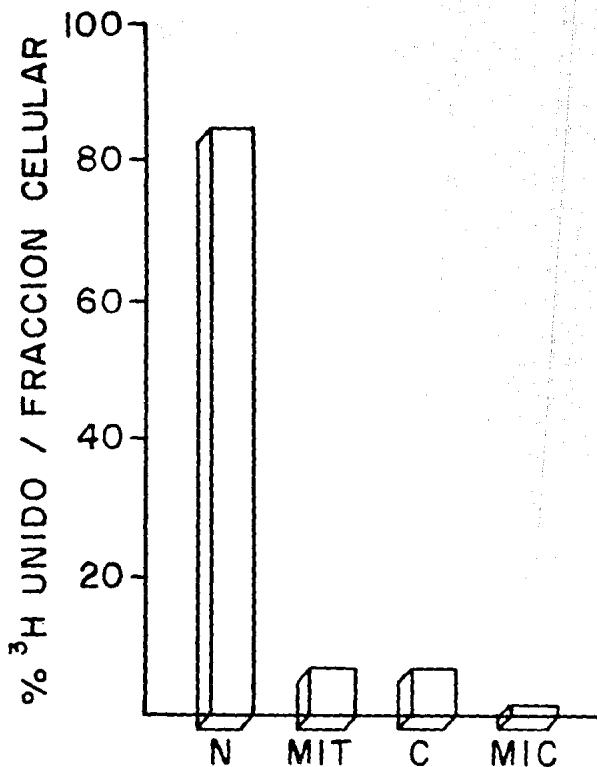


Fig. 10 Estudios a nivel subcelular del 3β -diol.

Las células fueron incubadas en 3 ml de MEM conteniendo 3β -diol ^3H 3nM + 3β -diol radioinerte 600 nM, la incubación se realizó a 37°C durante 60 min. Al finalizar la incubación las células se homogenizaron y se obtuvieron las fracciones subcelulares mediante centrifugaciones sucesivas. En cada fracción se midió la radiactividad unida, y los resultados se indican como % de unión en cada fracción subcelular. N (núcleos), MIT (Mitocondrias), C (Citosol) y MIC (microsomas).

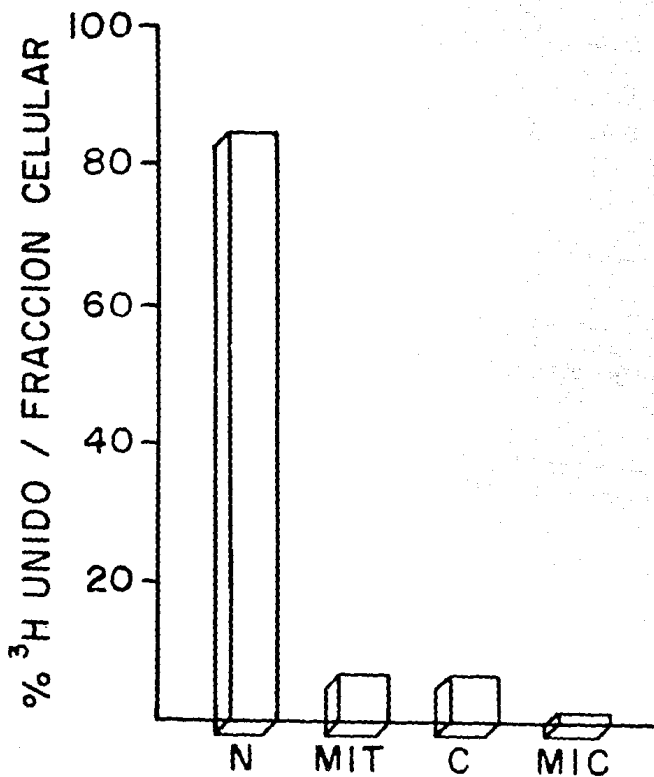


Fig. 10 Estudios a nivel subcelular del 3β -diol.

Las células fueron incubadas en 3 ml de MEM conteniendo 3β -diol ^3H 3nM + 3β -diol radioinerte 600 nM, la incubación se realizó a 37°C durante 60 min. Al finalizar la incubación las células se homogenizaron y se obtuvieron las fracciones subcelulares mediante centrifugaciones sucesivas. En cada fracción se midió la radiactividad unida, y los resultados se indican como % de unión en cada fracción subcelular. N (núcleos), MIT (Mitocondrias), C (Citosol) y MIC (microsomas).

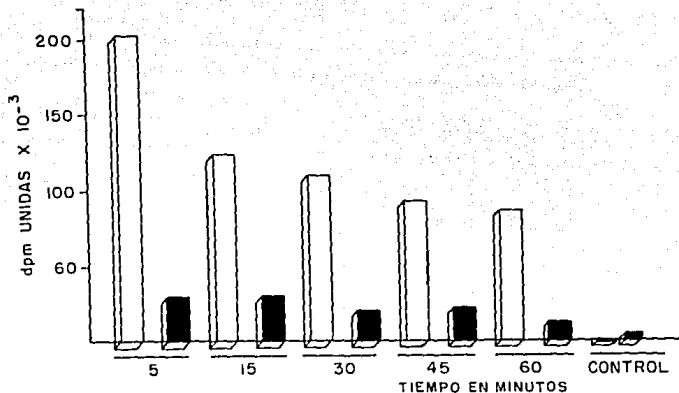


Fig. 11 Captación de 3β -diol ^3H a diferentes tiempos de incubación. Fibroblastos provenientes de individuos normales fueron incubados en 3 ml de MEM conteniendo 3β -diol ^3H 3 nM + 3β -diol radioinerte 600 nM a 37°C . Como control se incubaron células con 3β -diol ^3H 3 nM. De las células tratadas se obtuvieron los núcleos y el citosol como se indica en material y métodos y se cuantificó la radiactividad unida en cada fracción.

tarse el tiempo de contacto con el esteroide, la radiactividad va decreciendo y llega a ser constante entre 45 y 60 min. La captación en citosol es mucho menor que en núcleos y se mantiene constante a través del tiempo analizado. En este estudio se usó como control fibroblastos incubados durante 60 min. sólo con el esteroide radiactivo y como se puede observar en la gráfica no hubo retención de radiactividad en núcleo ni en citosol.

DISCUSION

Los resultados experimentales de la captación del metabolito reducido de la testosterona, el 5α -androstano 3β , 17β diol, por el fibroblasto humano muestran que este compuesto posee un comportamiento de unión que se podría considerar exclusivo o propio de su configuración, ya que moléculas estructuralmente similares; como su epímero 5α - androstano 3α , 17β diol o el 5α -androstano 17β ol-3 ona a diferencia del 3β -diol presentan un mecanismo de acción clásico para hormonas esteroides con actividad androgénica, y este ha sido extensamente estudiado y en la actualidad es bien conocido (17, 18).

Por el contrario el modo de acción a nivel celular del 3β -diol ha sido poco estudiado no obstante de que induce un número importante de efectos biológicos. Si bien se han caracterizado y cuantificado las propiedades de unión de otros sistemas de receptores para esteroides con actividad hormonal (1), éste no es el caso del 3β -diol.

En términos generales los procesos celulares involucrados en la expresión de la actividad biológica del 3β -Androstandiol no se conocen o no han sido determinados experimentalmente: el objetivo del presente trabajo es el conocer más acerca de su mecanismo de acción.

Como se menciona en la introducción el 3β -diol es un producto metabólico inmediato de la 5α -DHT, que es un andrógeno de gran actividad biológica. *A priori* se esperaría que el 3β -androstandiol siendo también un andrógeno interaccionara con los receptores de andrógenos presentes en las células blanco, es por esto que se eligió al fibroblasto humano, el cual contiene receptores de andrógenos, como modelo para el estudio del mecanismo de acción del 3β -diol. El modelo del fibroblasto ofrece ventajas adicionales respecto a otros tejidos ya que no sintetiza receptores intracelulares para estrógenos ni se ha detectado actividad de unión para progestinas. A diferencia

de lo que ocurre en tejidos en donde el 3β -diol es capaz de interactuar con otros sistemas de receptores que se caracterizan por tener alta afinidad y, capacidad limitada (64-68), el 3β -diol ^3H en el fibroblasto exhibe un patrón de captación distinto, y dependiente de la concentración agregada del 3β -diol radioinerte. Como se muestra en la figura 5, la retención del 3β -diol ^3H por el fibroblasto intacto, incubado a 37°C se vio incrementada únicamente cuando se agregó la hormona fría a una concentración 250 veces mayor que la radiactiva (750 nM). Este patrón de captación no ocurre en un sistema saturable de alta afinidad (1), y se aparta del modelo vigente de acción de los esteroides. Un sistema parecido aunque no idéntico ha sido descrito por el grupo de McGuire para el estradiol ^3H y al parecer es funcional en varios tejidos (77), sin embargo, este sistema no saturable, está estudiado en condiciones experimentales limitadas (4°C), diferentes a las empleadas para el 3β -diol ^3H (37°C).

La especificidad de la captación del 3β -diol ^3H fue estudiada inicialmente en fibroblastos intactos cultivados a 37°C . Como se muestra en las figuras 5 y 6, la retención del 3β -diol ^3H es lograda sólo cuando se agrega 3β -diol radioinerte al medio de incubación pero no cuando se incubaba con estradiol, 5α -DHT o su isómero 3α -diol a las mismas concentraciones. Estas observaciones sugieren que la retención es ejercida exclusivamente por la estructura que presenta el 3β -diol; esto es, la captación es específica para el 3β -diol y no ocurre con estructuras como la de la 5α -DHT. Este mismo fenómeno no se observó cuando se incubó con DHT ^3H bajo condiciones similares (Fig. 7), aún más la adición del isómero 3α -diol no modificó las características de captación para ninguno de los dos radioligandos como se muestra en la misma figura. Para que ocurra el aumento o incremento en la captación del 3β -diol ^3H es determinante alcanzar una concentración óptima (250 veces mayor que el esteroide radioactivo) del compuesto radioinerte. En un experimento adicional se confirmó la especificidad de unión del 3β -diol ^3H utilizando el esteroide sintético 3β -NET estructuralmente parecido y que posee propiedades similares al 3β -diol natural (74). Así mismo con el 3β -NET se logró incrementar la captación del 3β -diol ^3H , lo cual indica que esta configuración es específica para ejercer su función (Fig. 8).

Actualmente aun no conocemos el modo de acción del 3β -diol, en parte debido a que no se ha identificado un receptor específico para este derivado, por lo que se han propuesto varios mecanismos para

explicar cómo ejerce su efecto. Por ejemplo se ha sugerido reiteradamente que el 3β -androstano-17 β -diol posee afinidad por el receptor de estrógenos (64-68) y por lo tanto ejerce efectos estrogénicos (67, 74, 78). Sin embargo, si bien es cierto que el 3β -diol está provisto de actividad estrogénica intrínseca débil, la interacción con el receptor de estrógenos no parece ser la de un estrógeno típico, puesto que las afinidades entre el estradiol y su receptor, y el 3β -diol con el receptor de estrógenos son muy diferentes: el 3β -diol ^3H interacciona con lo que parece ser un receptor de afinidad relativamente baja, con una capacidad moderada (64-68), del orden de 1×10^{-8} M que de ninguna manera corresponde a las características de los receptores de estrógenos típicos los cuales poseen alta afinidad y son saturables a concentraciones bajas como 1×10^{-10} M o incluso menores.

El comportamiento de la reacción entre 3β -diol ^3H y el supuesto receptor de estrógenos encontrados por García (65) y Thieulant (64) en el citosol de varios tejidos animales, indica que el 3β -diol presenta una rápida disociación de su receptor *nativo*, esto es la forma 8 S y bajo sus condiciones experimentales el 3β -diol ^3H se asocia preferentemente a la fracción disociada (forma 4 S) del receptor de estrógenos, mientras que el estradiol ^3H se une principalmente a la forma *nativa* del receptor citosólico de estrógenos. La fracción a la cual se está uniendo el 3β -diol ^3H en los tejidos estudiados pareciera ser también inespecífica ya que a la adición del 3β -diol radioinerte no se modifica el patrón de sedimentación en gradientes de densidad de sacarosa. Otra posible explicación de la acción del 3β -diol sería que por modificaciones enzimáticas formara compuestos más activos como el 3α -diol o bien 5α -DHT, sin embargo, esto parece no ocurrir bajo condiciones fisiológicas normales (30).

La primera alternativa fue explorar la unión del 3β -diol en el citosol de los fibroblastos. Desafortunadamente, aunque la captación del 3β -diol ^3H en presencia de 3β -diol radioinerte es un fenómeno constante, la presencia de unidores específicos en la fracción citosólica del fibroblasto no fue encontrada. En la figura 8 se muestra la sedimentación del complejo 5α -DHT ^3H -receptor de citosol de fibroblastos (panel izquierdo), analizado en gradientes de densidad de sacarosa, y se muestra también que en condiciones similares el 3β -diol ^3H no se une al citosol de los fibroblastos (Fig. 9 panel derecho). Con estas observaciones se descarta que el 3β -diol se una a un receptor citosólico.

A fin de saber a qué sitio de la célula se une el 3β -diol ^3H cuando se incuba *in vivo* con el 3β -diol radioinerte, se obtuvieron fracciones subcelulares a partir de fibroblastos incubados con la hormona a 37°C . Como se muestra en la figura 10 la mayor captación de radiactividad se encontró en el compartimento nuclear, mientras que en la fracción mitocondrial y citosólica fue baja y menor aun en la fracción microsomal. Estos resultados confirman la ausencia de unión o retención en la fracción citosólica del fibroblasto, y demuestran, una interacción directa con el componente nuclear, esto es la captación del compuesto tritiado se une en el núcleo, esta observación está de acuerdo a lo reportado por Chamness y col. y por King y Green para el receptor de estrógenos con referencia a la saturabilidad y localización del receptor (77, 79).

Finalmente se estudió el tiempo óptimo de captación de la hormona por el núcleo celular. En la figura 11 se muestra la captación por el fibroblasto *in vivo* del 3β -diol ^3H más 3β -diol radioinerte incubado a 37°C a diferentes tiempos, la mayor retención fue observada a los 5 minutos de incubación y esta decae gradualmente conforme pasa el tiempo de exposición (60 minutos).

Esta rápida captación se obtuvo en estudios que se llevaron a cabo a temperatura fisiológica y será de interés estudiar tiempos de incubación de menor duración. Los resultados obtenidos permiten sugerir que el fenómeno de captación observado en condiciones experimentales controladas pudiera operar en condiciones fisiológicas.

Para la inducción del receptor de progesterona por el 3β androstandiol se requieren concentraciones farmacológicas más que fisiológicas (66), también el estímulo desencadenante de la hiperprolactinemia en la hipófisis anterior de la rata es mediada casi exclusivamente por la concentración del 3β -diol que se origina de la testosterona (40). Los datos presentados muestran que el 3β -androstandiol es internalizado rápidamente al interior del núcleo del fibroblasto sin tener como mediador intracelular un receptor de localización citosólica, este hecho que es también dependiente de la concentración del esteroide presente en el medio, difiere sustancialmente a los mecanismos de acción observados para casi todas las hormonas esteroides (80).

La entrada rápida a la célula y la unión directamente en el núcleo del 3β -diol, en el fibroblasto, no ha sido reportado a la fecha, sin embargo, se ha informado de la existencia de un sistema de interacción exclusivamente nuclear para el estradiol (79), el cual presumi-

blemente no es mediado por receptores citosólicos. Podría considerarse, en este caso particular que el 3β -diol lleva a cabo un mecanismo de acción similar a la del estradiol, sin embargo, la diferencia fundamental es que el 3β -androstano- 3β -diol ^3H requiere necesariamente de una concentración elevada de 3β -diol radiactivo para ser retenido en el compartimiento nuclear, a diferencia de lo que sucede con el estradiol ^3H .

La captación observada del 3β -androstano- 3β -diol por el núcleo del fibroblasto humano y su inesperada retención aumentada por la adición de altas concentraciones de este esteroide, podrían considerarse paradójicos, comparándolos con los mecanismos ampliamente conocidos de las hormonas esteroides.

Por otra parte relacionando los resultados experimentales obtenidos, con los datos existentes en la literatura, se podría sugerir, a manera de hipótesis, un posible mecanismo de acción del 3β -diol.

Inicialmente el 3β -diol es formado a partir de testosterona en las células de los órganos blanco en compartimentos específicos (fracción microsomal, núcleo) dentro de la célula. El 3β -diol difunde entonces al núcleo, en donde es retenido gradualmente por componentes específicos (adaptadores moleculares) de naturaleza posiblemente protéica, ya que la molécula esteroide por sí misma no es capaz de evocar una respuesta regulatoria (80). A continuación el complejo 3β -diol-receptor, se une a aceptores nucleares localizados en la cromatina, induciendo una respuesta reguladora semejante a la descrita para otras hormonas esteroides (80).

Un efecto inductor (regulador) del 3β -diol a nivel nuclear, ha sido descrito para la regulación de la actividad de la timidina cinasa en el endometrio humano y en células MCF-7 (67), así como también el efecto sobre la actividad de la RNA polimerasa inducido por el 3β -diol (78). La inducción de la síntesis de receptores para progesterona por el 3β -androstano- 3β -diol en varios tejidos animales ha sido también reiteradamente demostrada (67, 74, 78).

Este mecanismo podría explicar en parte una serie de alteraciones hormonales en los cuales está involucrado el 3β -diol, como sería el caso del hirsutismo, la oligospermia (45), y la hiperplasia prostática benigna (81). Con referencia a ésta última, se ha sugerido que el 3β -diol desempeña un papel importante en la génesis de la patología de la hiperplasia prostática (50). Tunn y col. (82) demostraron alteraciones en la hidroxilación del 3β -diol lo que produce acumulación

de este metabolito tanto en el estroma como en el epitelio de la próstata humana y se sugiere que este aumento en la concentración pudiera inducir el crecimiento celular (82).

El mecanismo propuesto en este trabajo también podría explicar en parte el efecto del 3β -diol sobre la secreción y crecimiento del epitelio prostático de células mantenidas en cultivo (39), el efecto sobre el adelanto de la pubertad en roedores (52-55), la inhibición de gonadotropinas inducida por el androstandiol (63, 83), y sus efectos en la síntesis de prolactina en la hipófisis anterior de la rata (40). Finalmente, la observación de que la mayor parte de la unión del 3β -androstandiol ^3H ocurre a nivel nuclear está fuertemente apoyada por los datos de Horst y col. (84) quienes demostraron que este metabolito se une inespecíficamente tanto a la porción mitocondrial como a la fracción microsomal (84) de la próstata ventral de la rata. Estos mismos resultados fueron encontrados en el fibroblasto humano (Figura 10) en el presente trabajo. La caracterización e identificación del sitio o sitios de interacción del 3β -androstandiol en el núcleo del fibroblasto y en otros tejidos animales se estudia actualmente en este laboratorio, para tratar de conocer el mecanismo de acción del 3β -Androstandiol.

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en el presente estudio fueron interpretados de la siguiente manera:

1. Existe una captación específica del 3β -diol por los fibroblastos mantenidos en cultivo, esta captación es dependiente de una concentración crítica del 3β -diol adicionado a la incubación, al llegar a esta concentración se ejerce un efecto sinérgico en la captación del esteroide por la célula.
2. No se encontró unión específica del 3β -diol a nivel citosólico, por lo que su mecanismo de acción difiere del de las hormonas esteroideas conocidas.
3. La retención del 3β -diol es exclusivamente nuclear, este fenómeno es importante ya que este organelo celular es el que regula la mayoría de los procesos celulares.
4. Finalmente se sugiere que la retención del esteroide a nivel celular puede operar en ciertas condiciones fisiológicas en las cuales está involucrado el 3β -diol.

APENDICE 1

Medio mínimo esencial (MEM).

Componentes	mg/l
<i>Sales inorgánicas:</i>	
CaCl ₂ (anhidro)	200.0
KCl	400.0
MgSO ₄ (anhidro)	97.6
NaCl	6800.0
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	140.0
<i>Otros componentes:</i>	
D-glucosa	1000.0
Rojo de fenol	10.0
<i>Aminoácidos:</i>	
L-alanina	8.9
L-arginina.HCl	126.0
L-asparagina.H ₂ O	15.0
L-ácido aspártico	13.3
L-cisteína.2 HCl	31.29
L-ácido glutámico	14.7
L-glutamina	292.0
Glicina	7.5
L-histidina HCl.H ₂ O	42.0
L-isoleucina	52.0
L-leucina	52.0
L-lisina HCl	72.5

L-metionina	15.0
L-fenilalanina	32.0
L-prolina	11.5
L-serina	10.5
L-treonina	48.0
L-triptofano	10.0
L-tirosina (sal disódica)	51.9
L-valina	46.0

Vitaminas:

D-Pantotenato de calcio	1.0
Cloruro de colina	1.0
Acido fólico	1.0
i-inositol	2.0
Nicotinamida	1.0
Piridoxal HCl	1.0
Riboflavina	0.1
Tiamina HCl	1.0

Aminoácidos no esenciales:

L-alanina	890.0
L-asparagina.H ₂ O	1500.0
L-ácido aspártico	1330.0
L-ácido glutámico	1470.0
Glicina	750.0
L-prolina	1150.0
L-serina	1050.0

APENDICE 2

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) de Dulbecco.

Componentes:	g/l
KCl	0.2
KH_2PO_4	0.2
NaCl	8.0
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.16
pH 7.4	

APENDICE 3

Determinación de proteínas por el método de Bradford.

I. Preparación del reactivo de Bradford:

1. Disolver 100 mg de azul de coomasie en 50 ml de alcohol etílico al 95%.
2. Agregar 100 ml de ácido fosfórico al 85% y aforar a 1000 ml con agua destilada.
3. Almacenar en botella ámbar a temperatura ambiente.

II. Preparación de la curva estandar:

1. Pesar 10 mg de BSA y disolverlos en 10 ml de sol. salina 0.15 M (sol. stock).
2. Leer en espectrofotometro a una longitud de onda de 278 nm utilizando como blanco sol. salina. La lectura debe ser de una DO de 0.66, de lo contrario ajustar.
3. Puntos de la curva:
 - a) 100 μg 0.1 ml de sol. stock.
 - b) 75 μg Tomar 3.75 ml de sol. stock, agregar 1.25 ml de sol. salina, cada 0.1 ml de esta sol. es igual a 25 μg .
 - c) 50 μg Tomar 2.5 ml de sol. stock, agregar 2.5 ml de sol. salina, cada 0.1 ml de esta sol. es igual a 50 μg .
 - d) 25 μg Tomar 1.25 ml de sol. stock, agregar 3.75 ml de sol. salina, cada 0.1 ml de esta sol. es igual a 25 μg .
 - e) 0 μg Tomar 0.1 ml de sol. salina.

Problemas:

1. Hacer diluciones de la muestra: (1:50, 1:100, 1:500, 1:1000).
2. A todos los tubos de la curva estandar y a los problemas se les agregan 5 ml de reactivo de Bradford.
3. Esperar 2 min. y leer en espectrofotometro a 595 nm.

APENDICE 4

Determinación de la concentración de ADN en solución por el método de Santoianni y Ayala

Reactivos:

1. Albúmina 1 mg/ml
2. Acido tricloroacético al 40% y 10% (TCA).
3. Diclorhidrato del ácido 3,5 diaminobenzoico (DABA).
4. Carbón dextrán.
5. HClO₄ al 0.6 N (guardar y usar en material plástico).
6. Papel filtro Whatman No. 1.
7. ADN de esperma de salmón (2 mg/ml de NH₄OH).
8. NH₄OH 0.4 N.

Método:

1. Las muestras se aforan con agua a un volumen de 0.5 ml.
2. Añadir 0.1 ml de albúmina 1 mg/ml.
3. Añadir 0.2 ml de TCA al 40%.
4. Dejar reposar a 4°C durante 2 horas.
5. Centrifugar a 2400 rpm durante 10 minutos en frío (0°C — 4°C).
6. Aspirar el sobrenadante y eliminarlo.
7. Añadir al precipitado 0.5 ml de TCA al 10%.
8. Agitar.
9. Centrifugar 10 min. a 2400 rpm en frío.
10. Aspirar el sobrenadante.
11. Añadir al precipitado 20 µl de 3,5 DABA previamente tratado con carbón dextrán. (Pesar 676 mg de 3,5 DABA y ponerlo en 2 ml de agua (1.5 M), agitar y agregar 2 mg de una mezcla carbón

dextran 10:1 p/p, agitar y centrifugar 10 min. a 2000 rpm a temperatura ambiente; filtrar (papel filtro Whatman No. 1), el filtrado se debe colectar en un tubo de plástico).

12. Cubrir los tubos con papel Parafilm.
13. Colocar los tubos en baño María a 60°C durante 30 min.
14. Parar la reacción poniendo 1.5 ml de HClO₄ al 0.6 N.
15. Agitar.
16. Centrifugar los tubos 10 min. a 2000 rpm a temperatura ambiente.
17. Leer las muestras en un fluorómetro usando un filtro primario de 405 nm y un filtro secundario de 520 nm. El sobrenadante se coloca, en la celdilla por decantación.

Curva Estándar:

1. Preparar solución de ADN de esperma de salmón a una concentración de 2 mg/ml en NH₄OH 0.4 N.
2. Hacer diluciones que contengan 0.1 µg/10 µl, 0.5 µg/10µl, 1.0 µg/10 µl, 3.0 µg/10 µl, 4.0 µg/10 µl, 5.0 µg/10 µl, 6.0 µg/10 µl, 7.0 µg/10 µl, 8.0 µg/10 µl, 9.0 µg/10 µl y 10.0 µg/10 µl.
3. Preparar triplicado con 10 µl de cada concentración y evaporar a sequedad a temperatura ambiente.
4. Agregar a cada tubo 20 µl de 3,5 DABA tratado con carbón dextran.
5. Meter los tubos a baño María a 60°C durante 30 minutos, junto con los tubos del problema.
6. Agregar 1.5 ml de HClO₄ 0.6 N.
7. Leer en el fluorómetro usando como blanco: 10 µl de NH₄OH en un tubo y tratados igual que los tubos anteriores.

REFERENCIAS

1. O'Malley, W. B. Schrader, T. W. 1976. The receptors of steroid hormones. *Sci. Am.* 234: 32-43.
2. Halkerston, I. A. K. Eich-horn, J. Hechter. 1961. A requirement for reduced thiphosphopyridine nucleotide for cholesterol side-chain cleavage by mitochondrial fractions of bovine adrenal cortex. *J. Biol Chem.* 236: 374-377.
3. Hall, F. P. Koritz, B. S. 1963. The cholesterol and 20 α -hydroxy-cholesterol to steroids by acetone powder of particles from bovine corpus luteum. *Biochem.* 3: 129-134.
4. Toren, D. Menon, J. M. K. Forchiell, E. Dorfman, I. R. 1964. *In vitro* enzymatic cleavage of the cholesterol side-chain in rat testis preparations. *Steroid.* 3: 381-390.
5. Murphy, P. E. B. 1968. Binding of testosterone and estradiol in plasma. *Can. J. Biochem.* 46: 299-302.
6. Mischke, W. Weis, H. G. Graesslin, D. 1979. Isolation of highly purified sex hormone binding globulin (SHBG): evidence for microheterogeneity. *Acta Endocrinol.* 90: 737-742.
7. Sandberg, A. A. Slaunwhite, W. P. 1963. Transcortin: A corticosteroid binding protein of plasma. V. *In vitro* inhibition of cortisol metabolism. *J. Clin Invest.* 42: 51-54.
8. Michelson, K. E. Harding, G. B. Forsthoefel, M. 1982. Steroid-protein interactions. Human corticosteroid binding globulin; characterization of dimer and electrophoretic variants. *Biochem.* 21: 654-660.
9. Corvol, L. P. Chrambach, A. Rodbard, D. Bardin, W. C. 1971. Physical properties and binding capacity of testosterone-estradiol binding globulin in human plasma, determined by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol Chem.* 246: 3435-3443.

10. Eik-nes, K. Schellman, A. J. Lumry, R. Samuels, T. L. 1954. The binding of steroids to protein. Solubility determinations. *J. Biol Chem.* 206: 411-419.
11. Jensen, V. E. Jacobson, I. H. 1962. Basic guides to the mechanism of strogen action. *Recent Progress in Hormone Reserch.* 18: 387-414.
12. Armstrong, Jr. E. G. Ville, C. A. 1977. Characterization and comparison of estrogen and androgen receptors of calf anterior pituitary. *J. Steroid Biochem.* 8: 285.
13. Smith, G. R. Iramain, A. C. Buttran, C. V. O' Malley, W. B. 1975. Purification of human uterine progesterone receptor. *Nature.* 253: 271-272.
14. Charest-boulé, L. 1978. Corticosteroid receptors in the avian kidney. *Steroid.* 32: 109-126.
15. King, R. J. B. Mainwaring, W. I. P. 1974. Steroid-cell interactions. London Butterworhts. ia. ed: 1-6, 21 y 22.
16. Baulieu, E. E. Jung, I. 1970. A prostatic cytosol receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 38: 599-606.
17. Fang, S. Anderson, K. M. Liao, S. 1969. Receptor protein for androgen. *J. Biol Chem.* 244: 6584-6595.
18. Minwaring, W. I. P. 1969. A soluble androgen receptor in the citoplasm of rat prostate. *J. Endocrinol.* 45: 531-541.
19. Steggles, W. A. Spelsberg, C. T. Glasser, R. S. O'Malley, W. B. 1971. Soluble complex between steroid hormones and target-tissue receptors binding specifically to target-tissue chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68: 1479-1482.
20. Spelsberg, C. T. Steggles, W. A. O'Malley, W. B. 1971. Progesterone binding components of chick oviduct. *J. Biol Chem.* 246: 4188-4197.
21. Kase, N. Forchielli, E. Dorfman, R. I. 1961. In vitro production of testosterone and androst-4-ene-3,17-dione in a human ovarian homogenate. *Acta Endocrinol.* 37: 19-23.
22. Binlingmaier, R. Dorr, G. H. Eisenmenger, W. Kuhnle, R. Knorr, D. 1986. Contribution of the adrenal gland to the production of androstendione and testosterone during the first two years of life. *J. Clin Endoc Metab.* 62: 331-335.
23. Griffin, J. E. Wilson, J. D. Disorders of the tests and male reproductive tract. In: Wilson, J. D. Foster, D. W. (Eds): Williams

10. Eik-nes, K. Schellman, A. J. Lumry, R. Samuels, T. L. 1954. The binding of steroids to protein. Solubility determinations. *J. Biol Chem.* 206: 411-419.
11. Jensen, V. E. Jacobson, I. H. 1962. Basic guides to the mechanism of strogen action. *Recent Progress in Hormone Reserch.* 18: 387-414.
12. Armstrong, Jr. E. G. Ville, C. A. 1977. Characterization and comparison of estrogen and androgen receptors of calf anterior pituitary. *J. Steroid Biochem.* 8: 285.
13. Smith, G. R. Iramain, A. C. Buttran, C. V. O' Malley, W. B. 1975. Purification of human uterine progesterone receptor. *Nature.* 253: 271-272.
14. Charest-boulé, L. 1978. Corticosteroid receptors in the avian kidney. *Steroid.* 32: 109-126.
15. King, R. J. B. Mainwaring, W. I. P. 1974. Steroid-cell interactions. London Butterworhts. ia. ed: 1-6, 21 y 22.
16. Baulieu, E. E. Jung, I. 1970. A prostatic cytosol receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 38: 599-606.
17. Fang, S. Anderson, K. M. Liao, S. 1969. Receptor protein for androgen. *J. Biol Chem.* 244: 6584-6595.
18. Minwaring, W. I. P. 1969. A soluble androgen receptor in the cytoplasm of rat prostate. *J. Endocrinol.* 45: 531-541.
19. Steggle, W. A. Spelsberg, C. T. Glasser, R. S. O'Malley, W. B. 1971. Soluble complex between steroid hormones and target-tissue receptors binding specifically to target-tissue chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68: 1479-1482.
20. Spelsberg, C. T. Steggle, W. A. O'Malley, W. B. 1971. Progesterone binding components of chick oviduct. *J. Biol Chem.* 246: 4188-4197.
21. Kase, N. Forchielli, E. Dorfman, R. I. 1961. In vitro production of testosterone and androst-4-ene-3,17-dione in a human ovarian homogenate. *Acta Endocrinol.* 37: 19-23.
22. Binlingmaier, R. Dorr, G. H. Eisenmenger, W. Kuhnle, R. Knorr, D. 1986. Contribution of the adrenal gland to the production of androstendione and testosterone during the first two years of life. *J. Clin Endoc Metab.* 62: 331-335.
23. Griffin, J. E. Wilson, J. D. Disorders of the tests and male reproductive tract. In: Wilson, J. D. Foster, D. W. (Eds): Williams

REFERENCIAS

1. O'Malley, W. B. Schrader, T. W. 1976. The receptors of steroid hormones. *Sci. Am.* 234: 32-43.
2. Halkerston, I. A. K. Eich-horn, J. Hechter. 1961. A requirement for reduced thiphosphopyridine nucleotide for cholesterol side-chain cleavage by mitochondrial fractions of bovine adrenal cortex. *J. Biol Chem.* 236: 374-377.
3. Hall, F. P. Koritz, B. S. 1963. The cholesterol and 20 α -hydroxy-cholesterol to steroids by acetone powder of particles from bovine corpus luteum. *Biochem.* 3: 129-134.
4. Toren, D. Menon, J. M. K. Forchiell, E. Dorfman, I. R. 1964. *In vitro* enzymatic cleavage of the cholesterol side-chain in rat testis preparations. *Steroid.* 3: 381-390.
5. Murphy, P. E. B. 1968. Binding of testosterone and estradiol in plasma. *Can. J. Biochem.* 46: 299-302.
6. Mischke, W. Weis, H. G. Graesslin, D. 1979. Isolation of highly purified sex hormone binding globulin (SHBG): evidence for microheterogeneity. *Acta Endocrinol.* 90: 737-742.
7. Sandberg, A. A. Slaunwhite, W. P. 1963. Transcortin: A corticosteroid binding protein of plasma. V. *In vitro* inhibition of cortisol metabolism. *J. Clin Invest.* 42: 51-54.
8. Michelson, K. E. Harding, G. B. Forsthoefel, M. 1982. Steroid-protein interactions. Human corticosteroid binding globulin; characterization of dimer and electrophoretic variants. *Biochem.* 21: 654-660.
9. Corvol, L. P. Chrambach, A. Rodbard, D. Bardin, W. C. 1971. Physical properties and binding capacity of testosterone-estradiol binding globulin in human plasma, determined by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol Chem.* 246: 3435-3443.

- textbook of endocrinology. 7th Edition. Philadelphia, USA. W. B. Saunders. 1985. 261-266.
24. Block, K. 1965. The biological synthesis of cholesterol. *Science*. 150: 19-28.
 25. Teicher, B. A. Shikita, M. Tlalay, P. 1978. Effects of adrenal steroid activator protein on the conversion of various 20 and 22- hydroxycholesterols to pregnenolone by adrenal mitochondrial enzymes. *Biochem Biophys Res Commun*. 83: 1436-1441.
 26. Constantopoulos, G. Carpenter, A. Saorh, P. S. 1966. Formation of isocaproaldehyde in the enzymatic cleavage of cholesterol side chain by adrenal extract. *Biochem*. 5: 1650-1652.
 27. Bruchovsky, N. Wilson, J. D. 1968. The conversion of testosterone to 5 α -androstano-17 β -ol one by all prostate *In vivo* and *In vitro*. *J. Biol Chem*. 243: 2012-2021.
 28. Moore, R. Wilson, J. D. 1972. Localization of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: Δ^4 -3-ketosteroid 5 α oxidoreductase in the nuclear membrane of rat ventral prostate. *J. Biol Chem*. 247: 958-967.
 29. Moore, R. Wilson, J. D. 1976. Steroid 5 α -reductase in cultured human fibroblast. *J. Biol Chem*. 249: 5895-5900.
 30. Gloyna, E. R. Wilson, J. D. 1969. A comparative study of the conversion of testosterone to 17 β hydroxi-5 α -androstano-3-one (dihydrotestosterone) by prostate and epididymus. *J. Clin Endoc Metab*. 29: 970-977.
 31. Sholiton, J. L. Wert, E. E. 1969. The less polar metabolites, produced by incubation of testosterone -4- 14 C with rat and bovine brain. *Acta Endocrinol*. 61: 641-648.
 32. Deneff, C. Magnus, C. McEwen, S. B. 1973. Sex difference and hormonal control of testosterone metabolism in rat pituitary and brain. *J. Endocrinol*. 59: 605-621.
 33. Jaffe, B. R. 1969. Testosterone metabolism in the target tissues: Hypotalamic and pituitary tissues of the adult rat and human fetus and the immature rat epiphysis. *Steroid*. 14: 483-498.
 34. Pérez-Palacios, G. Pérez, A. E. Jaffe, B. R. 1968. Conversion of pregnenolone-7 α - 3 H-sulfate to other Δ^5 -3 β hydroxysteroid sulfates by the human fetal adrenal *In vitro*. *J. Clin Endoc Metab*. 28: 19-25.
 35. Voigt, W. Fernández, P. E. Hsia, L. S. 1970. Transformation of

- testosterone into 17β hydroxy- 5α androstan- 3β one by microsomal preparations of human skin. *J. Biol Chem.* 245: 5594-5599.
36. Rampini, E. Voigt, W. Davis, P. B. Moretti, G. Hsia, L. S. 1971. Metabolism of testosterone- 4^{14}C by rat skin: variations during the hair cycle. *Endocrinology.* 89: 1506-1514.
 37. Maudelonde, Th. Rosenfield, L. R. Shuler, F. Ch. 1986. Studies of androgen metabolism and action in cultured hair and skin cells. *J. Steroid Biochem.* 24: 1053-1060.
 38. Wright, F. Giancomini, M. 1980. Reduction of dihydrotestosterone to androstane diols by human female skin *In vitro*. *J. Steroid Biochem.* 13: 639-643.
 39. Robel, P. Lasnitzki, I. Baulieu, E. E. 1971. Hormone metabolism and action: testosterone and metabolites in prostate organ culture. *Biochem.* 53: 81-96.
 40. Aakvaag, A. Haug, E. 1979. Metabolism of [^3H]-testosterone and [$1,2\text{-}^3\text{H}$] dihydrotestosterone by prolactin secreting rat pituitary tumour cells in culture. *J. Steroid Biochem.* 11: 1341-1346.
 41. Stewart, E. M. Pochi, E. P. Strauss, S. J. Woitz, H. H. Clarz, J. S. 1977. *In vitro* metabolism of [^3H] testosterone by scalp and back skin: conversion of testosterone into 5α -androstan- 3β , 17β -diol. *J. Endocrinol.* 72: 385-390.
 42. Wei Liu Kao, L. Pérez, L. A. Weisz, J. 1977. Metabolism *In vitro* of dihydrotestosterone 5α -androstan- 3α , 17β -diol and its 3β epimer, three metabolites, of its target tissues, the anterior pituitary, the medial basal hypothalamus and the seminiferous tubules. *J. Steroid Biochem.* 8: 1109-1115.
 43. Hodgins, B. M. Hay, B. J. 1973. Androgen Metabolism in the ventral sebaceous gland patch of the mongolian gerbil. *J. Endocrinol.* 59: 487-493.
 44. Guiraud, M. J. Morfin, R. Ducouret, B. Samperez, S. Jouan, P. 1979. Pituitary metabolism of 5α -androstan- 3β , 17β -diol: intense and rapid conversion into 5α -androstan- 3β , 6α , 17 triol and 5α , androstan- 3β , 7α , 17β -triol. *Steroid.* 34: 241-248.
 45. Hopkins, N. R. C. Park, K. B. Johnson, W. M. Sturm, G. Steinbach, K. Hirschauser, C. 1977. Concentrations of unconjugated 5α -androstan- 3β , 17β -diol in human peripheral plasma as measured by radioimmunoassay. *J. Biochem.* 8: 1253-1257.
 46. Corpechot, C. Eychenne, B. Robel, P. 1977. Simultaneous radioimmunoassay of testosterone, dihydrotestosterone, 5α -androstan- 3α ,

- 17 β -diol and 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol in the plasma of adult male rat. Steroid. 29: 503.
47. Baulieu, E. E. Jung, I. 1970. A prostatic cytosol receptor. Biochem Biophys Res Commun. 58: 599-606.
 48. Ofner, P. Richard, L. V. 1974. Acetylation and hydroxylation of 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol by prostate and epididymis. Steroid. 24: 261-279.
 49. Gittinger, W. J. Lasnitzki, I. 1972. The effect of testosterone and testosterone metabolites on the fine structure of the rat prostate gland in organ culture. J. Endocrinol. 52: 459-464.
 50. Robel, P. Lasnitzki, I. Baulieu, E. E. 1971. Hormone metabolism and action: testosterone and metabolites in prostate organ culture. Biochem. 53: 81-96.
 51. Davies, P. Fahmy, R. A. Pierripoint, G. C. Griffiths, K. 1972. Hormonal effects *In vitro* on prostatic ribonucleic acid polymerase. J. Biochem. 129: 1167-1169.
 52. Eckstein, B. Golan, R. Shani, J. 1972. Onset of puberty in the female rat induced by 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol. Endocrinology. 92: 941-945.
 53. Critchlow, B. Bar-sela, M. E. Martini, L. and W. F. Ganong (eds) Neuroendocrinology. Vol. II Academic Press New York 1967. p. 101.
 54. Eckstein, B. 1974. The origin of 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol and its 3 β epimer in peripheral blood of immature female rat. J. Steroid Biochem. 5: 577-580.
 55. Eckstein, B. Ravid, R. 1974. On the mechanism of the onset of puberty: Identification and pattern of 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol and its 3 α epimer in peripheral blood of immature female rats. Endocrinology. 94: 224-229.
 56. Mooradian, D. A. Horley, E. J. Korenman, G. S. 1978. Biological actions of androgens. Endocrine Reviews. 8: 14-15.
 57. Pochi, P. E. Strauss, J. S. 1974. Endocrinologic control of the development and activity of the human sebaceous gland. Invest. Dermatol. 62: 191.
 58. Nikkari, T. Valavaara, M. 1970. Effects of androgens and prolactin on the rat of production and composition of sebum in hypophysectomized female rats. J. Endocrinol. 48: 373-378.
 59. Ebling, J. F. Ebling, E. McCaffery, V. Skinner, J. 1971. The response of the sebaceous glands of the hypophysectomized-cas-

- trated male rat to 5 α -dihydrotestosterone, and androstendione dihydroepiandrosterone and androsterone. *J. Endocrinol.* 51: 181-190.
60. Ebling, J. F. Ebling, E. McCaffery, V. Skinner, J. 1973. The responses of the sebaceous glands of the hypophysectomized-castrated male rat to 5 α -androstendione and 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol. *J. Invest Dermatol.* 60: 183-187.
 61. Wei Liu Kao, L. Weiz, J. 1975. Direct effects of testosterone and its 5 α reduced metabolites on pituitary LH and FSH release *In vitro*: change in pituitary responsiveness to hypothalamic extract. *Endocrinology.* 96: 253-260.
 62. Zanisi, M. Motta, M. Martini, L. 1973. Inhibitory effect of 5 α reduced metabolites of testosterone on gonadotrophin secretion. *J. Endocrinol.* 56: 315-316.
 63. Verhans, L. H. Eik-nes, K. B. 1977. Gonadotrophin supresion by steroids in normal adult male rats. *Acta Endocrinol. (Kbh).* 84: 842-849.
 64. Thieulant, M. L. Samperez, S. Jouan, P. 1981. Evidence for 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol binding to the estrogen receptor in the cytosol from male rat pituitary. *Endocrinology.* 108: 1552-1560.
 65. Garcia, M. Rochefort, H. 1979. Evidence and characterization of the binding of two [³H]-androgens in the estrogen receptor. *Endocrinology.* 104: 1797-1804.
 66. Thieulant, M. L. Benie, T. Michaud, S. Klein, H. Vessieres, A. 1983. Binding and effects of 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol in the male rat pituitary. *J. Steroid Biochem.* 19: 241-246.
 67. Kreitmann, B. Bayard, F. 1979. Androgen interaction with the estrogen receptor in human tissues. *J. Steroid Biochem.* 11: 1589-1595.
 68. Thieulant, M-L. Samperez, S. Jouan, P. 1978. Androgens binding proteins in the cytosol from prepubertal male rat hypothalamus preoptic area and brain cortex. *J. Steroid Biochem.* 9: 147-151.
 69. Donna, D. Hirschhorn, K. New, I. M. 1972. Metabolism of testosterone -¹⁴C by cultured humans cells. *J. Clin Invest.* 51: 1459-1468.
 70. Mowszowicz, I. Riahi, M. Wrigth, F. Bouchard, P. Kutten, F. Mauvais-Jarvis, P. 1981. Androgen receptor in human skin cytosol. *J. Clin Endocrinol Metab.* 52: 338-340.
 71. Medina, M. Chávez, B. Pérez-Palacios, G. 1981. Defective androgen action at the cellular level in the androgen resistance syn-

- drome. I Differences between the complete and incomplete testicular feminization syndromes. *J. Clin Endocrinol Metab.* 53: 1243-1249.
72. Bruning, P. F. 1979. Glucocorticoid receptor in cultured human skin fibroblast. *J. Steroid Biochem.* 10: 587-593.
73. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochem.* 72: 248-254.
74. Vilchis, F. Chávez, B. Pérez, A. E. García, G. A. Angeles, A. Pérez-Palacios, G. 1986. Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progesterin receptors. *J. Steroid Biochem.* 24: 525-531.
75. Schneider, C. W. and Hogeboom, H. G. 1950. Intracellular distribution of enzymes V. further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates. *J. Biol Chem.* 183: 123-128.
76. Santoianni, P. Ayala, M. 1965. Fluorometric ultramicroanalysis of deoxyribonucleic acid in human skin. *J. Invest Dermatol.* 45: 99-103.
77. Chamness, C. G. Jennings, W. A. McGuire, L. W. 1974. Estrogen receptor binding to isolated nuclei a nonsaturable process. *Biochem.* 13: 327-331.
78. Ho, S. Levin, V. 1986. Induction of progesterone receptor by androgens in the mouse uterus. *Mol. and Cell. Endocrinology.* 46: 103-108.
79. King, J. W. Greene, L. G. 1984. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature.* 307: 745-749.
80. Yamamoto, R. K. 1985. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Ann Rev Genet.* 19: 209-252.
81. Bartsch, W. Kozak, I. Gorenflos, P. Becker, H. Voigt, D. K. 1986. Concentrations of 3β -hydroxy androgens in epithelium and stroma of benign hyperplastic and normal human prostate. *The Prostate.* 8: 3-10.
82. Tunn, S. Claus, S. Schulze, H. Braun, E. B. Krieg, M. 1987. 5α -androstane- 3β , 17β -diol hydroxylating enzymes in stroma and epithelium of human benign prostatic hyperplasia (BHP). *J. Steroid Biochem.* 28: 257-265.

83. Loseva, A. L. Degtiar, G. V. Isachenkov, A. V. 1980. 5α -androstane- 3β , 17β -diol in feedback between gonads and hypothalamo-pituitary system of male rats. *J. Steroid Biochem.* 13: 939-944.
84. Horst, J. H. Klotzl, G. Stromberg, U. 1979. Metabolism and binding In vitro of 5α -androstane- 3β , 17β -diol and of 5α -androstane- 3α , 17β -diol in cell fractions of rat ventral prostate and liver.